

THESIS

Bochum 1967

Untersuchungen über die Neuraminidase aus *Clostridium perfringens*

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Abteilung für Naturwissenschaftliche Medizin
an der Ruhr-Universität Bochum

von

Peter Segschneider
Neiße

Bochum 1967



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Untersuchungen über die Neuraminidase aus *Clostridium perfringens*

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Abteilung für Naturwissenschaftliche Medizin
an der Ruhr-Universität Bochum

von

Peter Segschneider
Neiße

Bochum 1967

Dissertation eingereicht am

19.9.1967

Tag der mündlichen Prüfung:

8.11.1967

Referent:

Prof. Dr. H. Faillard

Koreferent:

Prof. Dr. K. Esser

Meiner Mutter gewidmet

Meinem sehr verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Hans Faillard, möchte ich für die Einführung in die physiologische Chemie und für die tatkräftige Förderung dieser Arbeit meinen ergebensten Dank aussprechen.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern der Institute für Physiologische Chemie und Allgemeine Botanik der Ruhr-Universität, die meiner Arbeit mit Interesse folgten und mir in vielen Diskussionen wertvolle Ratschläge erteilten.

INHALTSVERZEICHNIS

A. Theoretischer Teil

Seite

I. Einführung	1
II. Überblick	3
1. Die Virushämagglutination	3
2. Das "RDE" - Prinzip	4
3. Die biochemische Wirkungsweise der Neuraminidase	5
III. Vorkommen der Neuraminidase	13
1. Übersicht	13
2. Erläuterungen	15
IV. Biologische Eigenschaften Neuraminsäure- haltiger Substanzen und ihre Veränderung durch Neuraminidase	20
1. Die Glykoproteine	23
2. Die Ganglioside	24
3. Neuraminsäuregehalt und biologische Wirkung von Proteohormonen.....	25
V. Methoden zur Bestimmung der Neuraminidase- Aktivität	27
VI. Stabilität der Neuraminidase	32
VII. Reinheitskriterien, Spaltungs- und Sub- stanzcharakteristika und Reinigung der Neuraminidasen	38
VIII. Problemstellung	45

INHALTSVERZEICHNIS

B.	Experimenteller Teil	Seite
I.	Methoden	47
1.	Bestimmung der Neuraminidase-Aktivität ...	47
a)	Reagentien zur Bestimmung der Enzym- einheit	48
b)	Methode nach Aminoff zur Bestimmung freier N-Acetylneuraminsäure	49
c)	Ausführung der Aktivitätsbestimmung ...	52
2. a)	Bestimmung der Gesamtneuraminsäure nach Bial	54
b)	Bestimmung der säurehydrolytisch spalt- baren N-Acetylneuraminsäure nach Warren	54
3.	Ermittlung des Proteingehaltes	
a)	Relativer Proteingehalt der Fraktionen bei Säulenchromatographie	54
b)	Vergleich der UV-Absorptionen bei 280 und 260 mμ ,	55
c)	Proteinbestimmung nach Folin	55
4.	Durchführung der Gelfiltration	56
a)	Vorbereitungen der Gelpackungen zur Säulenchromatographie	56
b)	Entsalzung und Konzentrierung von Pro- teinlösungen	57
c)	Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe der Gelfiltration	57
5.	Anzucht des Cl.perfringens	58
6.	Gewinnung des Kulturfiltrates	59

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
II. Rohenzymkonzentrat	61
1. Präzipitation mit Ammonsulfat	61
2. Versuch einer Fraktionierung des Kon- zentrates mit gesättigter Ammonsulfat- lösung	61
III. Chromatographische Reinigung des Rohenzyms	63
1. Versuche mit	
a) Säulenchromatographie an Hydroxylapatit	63
b) Chromatographie an DEAE-Cellulose	63
c) Säulenchromatographie an Sephadex G-75 und DEAE-Cellulose	64
2. Säulenchromatographie an Sephadex G-200 ..	68
IV. Charakterisierung des Enzyms	72
1. Neuraminidase - Protein Adsorbate	72
a) Chromatographie des Neuraminidase- Rinderserumalbumin - Komplexes an Sephadex G-200	72
b) Versuch der Dissoziation des Neurami- nidase-Albumin Komplexes	78
c) Bildung eines Neuraminidase-Cytochrom c Adsorbates	80
2. Untersuchung zum Molekulargewicht der Neuraminidase	84
3. Enzymkinetik	86
a) Reaktionsgeschwindigkeiten mit Gangliosid und α -Benzylglykosid der N-Acetylneuraminsäure	86
b) Ermittlung der Michaeliskonstanten	89
V. Diskussion der experimentellen Ergebnisse ...	98
VI. Zusammenfassung	105
Literaturnachweis	107

A. I. Einführung

Neuraminidase (N-Acetylneuraminat-Glykohydrolase, E C 3.2.18 (61)) oder Sialidase ist als enzymatisches Prinzip seit 1941 (96) und 1942 (98) bekannt. Damals entdeckte G.K. Hirst zwei biologische Teilkomponenten im Myxovirus: das Hämagglutinin, mit dessen Hilfe sich die Myxoviren an zwei oder mehrere Erythrocyten anlagern können und so eine Hämagglutination hervorrufen, und eine Komponente mit offenbar enzymatischen Eigenschaften, die wieder eine Loslösung des Virus von der Erythrocytenoberfläche und deren gleichzeitige biologisch-chemische Veränderung bewirkt.

In vielen Einzelergebnissen wurde bis heute über die Verbreitung dieses Enzyms in Mikroorganismen und Wirbeltierorganen (Tabelle 2) und über mannigfache Veränderungen der biologischen Wirkung von Substraten des Enzyms (Tabelle 3) berichtet. Mit dem Bestreben, die chemische Konstitution der Substrate, ferner die Natur des Enzyms und schließlich die Enzymreaktion selber in ihrem chemischen Ablauf vollständig aufzuklären, wuchs zwangsläufig das Bedürfnis nach höchstmöglicher Reinigung von Neuraminidasen der verschiedensten biologischen Herkunft sowie nach der Darstellung chemisch genau definierter Substrate.

In letzter Zeit war diesem Bemühen auf der Seite der Substrate mit der Darstellung halb- (138 - 143, 70) und vollsynthetischer (71) Substanzen niedrigen Molekulargewichtes ein vorläufiger Erfolg beschieden (s.a. Tabelle 1). Auf seiten der Versuche, das Enzym in seiner reinen Form zu isolieren, führten die Ausnutzung der spezifischen Bindung des Enzyms an sein Substrat und der

A. I. Einführung

relativ langsam verlaufenden enzymatischen Reaktion durch Schramm und Mohr (162) bzw. die Zuhilfenahme neuartiger Reinigungsmethoden für Enzymproteine durch Ada und French (2) zur Isolierung der Neuraminidase aus dem Kulturfiltrat von *Vibrio cholerae* in gereinigter, kristallisierter Form.

Die Unterschiedlichkeiten einiger Enzymcharakteristika (Tabelle 6) und vor allem der Molekulargewichte dieser Präparate (Tabelle 7) ließen jedoch schon damals erkennen, daß die Kristallisation eines Neuraminidase-aktiven Proteins nicht gleichbedeutend mit absoluter Reinheit des Enzyms zu sein braucht. Dies konnten Rosenberg et al. 1960 (160) bei der Präparation des gleichen *V. cholerae*-Enzyms zeigen, als sie ein kristallisierendes Enzympräparat mittels weiterer Reinigungsschritte 300 mal reiner erhielten.

Auf den Gesichtspunkt, daß "der Akt der Kristallisation enzymatisch aktiver Proteine nicht Krönung, sondern Kernpunkt des Isolierungsganges sein muß", wiesen schon Beisenherz et al. 1953 (18) in einem Bericht aus dem Warburg'schen Institut über Reindarstellung zuckerspaltender Enzyme aus Kaninchenmuskulatur hin. Während diese Autoren jedoch mittels einer einzigen Reinigungsmethode, der fraktionierten Fällung der Eiweiße mit Ammoniumsulfat unter verschiedenen Bedingungen, zum Ziele kamen, scheinen ihrer Forderung bei der Isolierung einzelner Neuraminidasen bis heute zum Teil unüberwindliche Schwierigkeiten im Wege zu stehen.

A. II. Überblick

1) Die Virushämagglutination

Die wissenschaftlichen und experimentellen Grundlagen zu den Untersuchungen über die Neuraminidase boten zunächst die schon kurz skizzierten Erkenntnisse von G.K. Hirst (96) und McClelland und Hare (134) aus dem Jahre 1941, daß Influenzavirus-haltige Allantoisflüssigkeit von Hühnerembryonen eine Hämagglutination hervorruft. Hirst (97) zeigte, daß dies auf ein im Virus vorhandenes Agglutinin zurückgeführt werden muß, indem sich diese Viruskomponente wie eine Brücke mit zwei oder mehreren Erythrocyten verbindet und so die im Agglutinat sichtbaren Stränge und Klumpen entstehen läßt. Inkubiert man ein solches Agglutinat zwei Stunden bei 37°C, so ergeben die vorher von Plasma reingewaschenen Erythrocyten wieder eine stabile Suspension, wie vor der Viruszugabe (Hirst 1942 (98)); sie sind danach aber durch keinen Stamm der Influenzavirusgruppe mehr agglutinabel und können darüber hinaus durch jedes beliebige Serum zur Verklumpung gebracht werden (Panagglutinationsphänomen, s.u.). Die von den Erythrocyten abgelösten Viren dagegen sind wieder in der Lage, mit frischen Erythrocyten auf die gleiche Art wie vorher zu reagieren.

Die Blutkörperchen mußten mithin in irgendeiner Weise durch eine zweite, nach Hirst (98) enzymatische Teilkomponente des Virus hinsichtlich ihrer Receptorfähigkeit für das Virusagglutinin geschädigt worden sein.

A. II. Überblick

2) Das "RDE"-Prinzip

Das Panagglutinationsphänomen hatte Thomsen 1926 (181) zeitweilig bei Blutgruppentesten menschlicher Erythrocyten beobachtet, was nach Friedenreich 1927 (79) seine Ursache in bakteriellen Verunreinigungen der benutzten Blutkörperchen hatte, denn auch Kulturfiltrate diphtheroider Bakterien und Vibrionen veränderten sie ebenfalls im Sinne der Panagglutination.

Angeregt durch die Ähnlichkeit, mit der sich durch Influenzavirus geschädigte Erythrocyten und solche, die man mit bakteriellen Kulturfiltraten behandelt hat, nach der Einwirkung beliebiger Seren verhalten, versetzten Burnet et al. 1946 (33) menschliche Erythrocyten mit *V. cholerae*-Kulturflüssigkeit. Sie fanden, wie zu erwarten war, ihre Veränderung im Sinne der Panagglutinierbarkeit, konnten jedoch außerdem feststellen, daß nach Einwirkung des bakteriellen Enzyms die Agglutinierbarkeit durch Influenzavirus aufgehoben war. Burnet (40) vermutete deshalb, daß das im *V. cholerae*-Kulturfiltrat gelöste Enzym den Receptor für das Influenzavirus an der Erythrocytenoberfläche bezüglich seiner biologischen Funktion zerstört haben mußte.

Burnet nannte dieses Enzym in *V. cholerae*-Kulturfiltrat deshalb "Receptor Destroying Enzyme" (RDE).

McCrea fand 1947 (135) auch in Kulturfiltraten einiger *Cl. perfringens* - Stämme ein RDE - wirksames Prinzip, das sich aber von den bislang bekannten Enzymen der Influenzaviren und anderen bakteriellen RDEs (Tabelle 2)

A. II. Überblick

darin zu unterscheiden schien, daß es für seine Wirkung keine Calciumionen benötigt. Später konnte dies von mehreren Autoren (149) (41) (47) bestätigt und auch für Neuraminidasen anderer Herkunft gezeigt werden (Tabelle 2)¹.

3) Die biochemische Wirkungsweise der Neuraminidase

Nachdem es 1947 Briody (28) beim Erhitzen von Influenzavirus - Suspension 30 Min auf 55°C durch Inaktivierung nur der enzymatischen Komponente gelungen war, den Beweis für die Existenz zweier unterschiedlicher Teilkomponenten im Influenzavirus zu erbringen, benutzte Burnet (37) in seinen Versuchen mit Hämagglutinationshemmstoffen dieses teillinaktivierte, nicht mehr infektiöse Virus als "Indikatorvirus". Er fand nämlich, daß dieses Virus geradezu wie ein Indikator das Vorhandensein eines unspezifischen Inhibitors anzeigt, indem es sich mit dem Receptor solcher Substanzen zwar zu verbinden (Agglutinin Komponente) aber nicht mehr wie ein intaktes Virus von ihm zu lösen (Enzymkomponente) vermag. Das Ausbleiben der Hämagglutination in einem Gemisch von Indikatorvirus mit frischen Erythrocyten deutet somit auf das Vorhandensein eines löslichen, unspezifischen Inhibitors der Agglutination hin (unspezifischer Hämagglutinations-Hemm-Test).

Nach neueren Untersuchungen von Howe et al. 1961 (99) sowie Darell und Howe (54) besteht zwar kein Zweifel, daß Hämagglutinin und RDE des Influenzavirus zwei voneinander unabhängige Substanzen sind; betrachtet

A. II. Überblick

man jedoch das Phänomen "Indikatorvirus" bei verschiedenen Myxoviren, so scheint nur der Verlust der Infektiosität bei allen Typen reproduzierbar zu sein. Während sich zum Beispiel Influenzavirus Typ Lee nach Erhitzen wie ein "klassisches" Indikatorvirus verhält - Verlust von Infektiosität und RDE-Aktivität -, sind Hämagglutinin und Enzym bei Newcastle Disease Virus gleichermaßen hitzelabil, und bei Influenzavirus Typ A sowie Parainfluenzavirus Typ 1 ist schließlich das Hämagglutinin hitzeempfindlicher als die Enzymkomponente.

Francis fand 1947 einen in tierischen Seren enthaltenen, unspezifischen - d.h. nicht im Sinne einer Antigen-Antikörperreaktion entstandenen - Hemmstoff der Virus-hämagglutination (Francis - Inhibitor), und Burnet et al. (34) (36) gelang die Gewinnung weiterer löslicher Inhibitoren, des Speicheldrüsen-Mucins und des Ovarialcysten-Mucins.

Da es hoffnungslos erschien, die Natur des Receptors bzw. seine enzymatisch bedingte "Zerstörung" wegen der zunächst kaum zur Isolierung ausreichenden Mengen an enzymatisch abgespaltener Substanz von Erythrocyten näher zu studieren, gingen Gottschalk und Lind 1949 (87) daran, Influenzavirus und RDE aus *V.cholerae* - Kulturfiltrat auf Ovarialcysten - Mucin einwirken zu lassen. Dabei leitete sie die Vorstellung, daß die Hämagglutinationshemmwirkung der Mucin-Inhibitorsubstanzen auf einer Konkurrenzreaktion mit einem gleichen Receptor beruhe. Sie erhielten eine niedermolekulare, dialysierbare und stickstoffhaltige Substanz, die die indirekte Ehrlich'sche Farbreaktion (s.u.) gab und bezeichneten sie als Kohlehydrat-Peptidkomplex mit alkalilabiler, glykosidischer Bindung an die Neutralzucker des Mucins.

A. II. Überblick

Bei einer Wiederholung der Gottschalk'schen Versuche fand Odin 1952 (147), daß die isolierte Substanz neben der direkten Ehrlich'schen Farbreaktion (s.u.) auch eine rot-violette Farbe mit dem Bial'schen Orcin-reagens gab, die Klenk 1941 (106) und 1942 (107) für eine aus Gehirnlipoiden (Gangliosiden) isolierte und Neuraminsäure genannte Substanz als charakteristisch bezeichnet hatte.

Die Substanz, die in Form eines Methylglykosids aus Gehirnen bei amaurotischer Idiotie vom Typ Tay-Sachs gewonnen werden konnte (106), hielt Klenk (107) wegen ihrer chemischen Eigenschaften für eine Polyhydroxy-aminosäure.

Aus Rindersubmaxillarismucin hatte Blix 1940 (21) eine Substanz isoliert, die er zunächst als ein Hexosamin mit saurer Gruppe und zwei Acetylgruppen bezeichnete, und die mit dem Ehrlich'schen P-Aminobenzaldehyd-Reagens sowohl mit Alkalivorbehandlung (indirekt) als auch ohne Alkalivorbehandlung (direkt) eine stark rote Farbe gab. Aufgrund späterer Ergebnisse charakterisierte er sie (22) als Acetylderivat einer der Neuraminsäure ähnelnden Polyhydroxysäure und nannte sie wegen ihres Vorkommens in Speicheldrüsen Sialinsäure.

1954 gelang es Klenk und Faillard (108) durch hydrolytische Spaltung von Rindersubmaxillarismucin in verdünnter Salzsäure und anschließende chromatographische Reinigung des Spaltproduktes, eine N-Acetylverbindung der Neuraminsäure (NS) erstmals in reiner, kristallisierter Form darzustellen, diese ferner durch Behandlung

A. II. Überblick

mit methanolischer Salzsäure in die Methoxylverbindung zu überführen und damit den Beweis zu erbringen, daß N-Acetylneuraminsäure (N-ANS) und Sialinsäure identisch sind und die native Form der als Methyglykosid isolierten Neuraminsäure am Gangliosid darstellen.

Die Verbindung der über das RDE-Prinzip gewonnenen Ergebnisse mit den Erkenntnissen über die Neuraminsäure konnten Klenk, Faillard und Lempfrid 1955 (109) und Faillard 1956 (62) herstellen, als sie erstmals mit Sicherheit die unter der Einwirkung von Influenza B Lee Virus und RDE aus *V. cholerae* von Erythrocyten, Harn- und Submaxillarismucinen abgespaltene Substanz als N-Acetylneuraminsäure erkannten und in kristallisierter Form isolierten. Dieses Enzym wird seither als Neuraminidase bezeichnet (23).

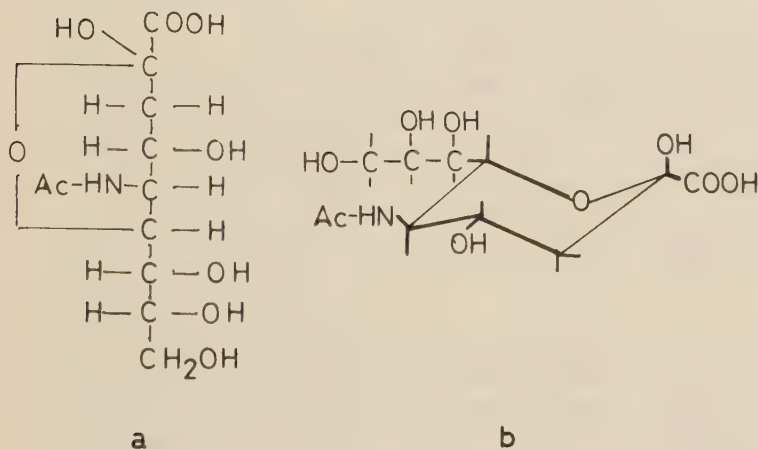
In der Folgezeit konnte gezeigt werden, daß durch Einwirkung von Neuraminidase verschiedenen Ursprungs (s. Tabelle 2) jegliches NS enthaltende Material (s.a. Tabelle 3) hydrolysiert wird, was die generelle Gleichsetzung der Neuraminidase mit dem RDE-Prinzip ermöglicht.

Aber nicht nur die in Glykoproteinen enthaltene N-Acetylneuraminsäure dient als Receptor für Myxoviren, wie Klenk und Uhlenbruck 1957 (112) und Faillard 1959 (64) zeigen konnten, und wird von ihnen enzymatisch abgespalten (64), sondern auch ihre N-Glykoly- und N,O-Diacetyl-derivate, letztere allerdings in einem geringeren Ausmaß. Entfernt man aber die sauerstoffständige Acetylgruppe durch Alkalibehandlung des Mucins, so läßt sich die zurückbleibende N-ANS leicht enzymatisch abspalten (64).

A. 11. Überblick

Damit erwies sich die Neuraminidase als hydrolytisches Enzym für alle bisher bekannten N- und O-substituierten Neuraminsäuren.

Die Konstitution des C_9 -Körpers der NS konnte durch ihre enzymatische Spaltbarkeit mit N-ANS-Aldolase als Kondensationsprodukt aus Brenztraubensäure und D-Mannosamin aufgeklärt werden (31) (50). Die noch bis 1962 ungeklärte Frage nach der Konstitution der Hydroxylgruppe am C_4 der NS, das identisch ist mit dem C_1 des D-Mannosamin, konnten Kuhn und Brossmer (12) durch Abbau der N-ANS zu einem Pentantriol, dessen Substanzcharakteristika durch Synthese bekannt waren, aufklären.



Figur 1: Konstitution der N-Acylneuraminsäure in der Schreibweise nach Fischer (a) und in der Konformationsformel (b). Ac- : Acetyl- oder Glykoly-.

A. II. Überblick

Die in den Substraten der Neuraminidase enthaltene Neuraminsäure ist jedoch oft nicht oder nur teilweise enzymatisch abspaltbar. So fand Faillard (62, 63), daß aus dem Tay-Sachs-Gangliosid (106) keine NS abgespalten wird; Rosenberg et al. gelang 1960 (160) aus einem "Mucolipid" (159) gesunder Ochsengehirne eine enzymatische NS-Abspaltung von nur 72 %, und Burton berichtete 1963 (41) über eine enzymatische Abspaltung von höchstens 50 % der in Gangliosidgemischen aus gesunden Rinder- und Rattengehirnen enthaltenen Neuraminsäuren.

Der aus Gangliosiden nicht enzymatisch abspaltbare Anteil des NS-Gehaltes ist nach Klenk et al. (116, 117) aus sterischen Gründen der Enzymwirkung entzogen (s. Kap. A.IV.: Struktur der Ganglioside).

Während die in Glykoproteinen niedrigen Molekulargewichtes enthaltene NS vollständig enzymatisch abspaltbar ist, liegt die Abspaltungsrate bei solchen mit hohem Molekulargewicht nur bei 60 - 80 % (84). Spaltet man ein hochmolekulares Glykoprotein durch Peptidase in kleinere Bruchstücke auf, so wird die enthaltene NS für Neuraminidase voll angreifbar (20).

Nach Untersuchungen an Neuraminidase-spaltbarem Trisaccharid (N-ANS-Laktose, "Sialyllactose") aus menschlichem Colostrum (119) postulierte Kuhn 1958 (120), daß das Enzym als α -Ketosidase zu charakterisieren sei, die die enzymatische Hydrolyse von α -Ketosiden der N-ANS mit D-Galaktose bewirkt (120). Diese Annahme konnte aber erst in den letzten Jahren experimentell bestätigt werden, nachdem es Meindl und Tuppy (141)

A. II. Überblick

und Faillard und Blohm (71) gelungen war, enzymatisch spaltbare α -Ketoside der N-Acylneuraminsäuren zu synthetisieren (s. Übersicht Tabelle 1).

Da die meisten synthetischen NS-Ketoside nicht in der Natur vorkommen (künstliche Aglyka) und trotzdem einige von ihnen Neuraminidase-spaltbar sind, erscheint die Natur des Aglykon für die enzymatische Angreifbarkeit der NS- α -Ketoside von geringerer Bedeutung zu sein: außer den in biologischem Material nachgewiesenen Bindungspartnern der NS, Galaktose und N-Acetyl-galaktosamin (85, 117, 150) wurden auch die α -ketosidischen Neuraminsäurebindungen an Alkyl- und Arylreste aufgespalten.

NS-Derivat	Art des ketosid.ggeb.Aglykon	Enzymatische Spaltbarkeit		Michaelis-Konstanten	
		V.chol.	Infl.A	V.chol.	Infl.A
N-Acetyl	2-Methyl	+	nicht best.	$2 \cdot 10^{-3}$	nicht best.
"	2-m-Nitrobenzyl	++	++	$9 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$
"	2-n-Decyl	+	+	$7 \cdot 10^{-3}$	$9 \cdot 10^{-4}$
"	2-n-Amyl	+	+	$4 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$
N-Acetyl-Methyl-ester	2-Methyl	-+)	++) nicht best.		
N-Acetyl	2-Benzyl ⁺⁺⁺⁾	0.087	0.220	$4 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$
N-Glykolyd	2-Benzyl ⁺⁺⁺⁾	0.057	0.049	nicht best.	nicht best.
N-Propionyl	2-Benzyl ⁺⁺⁺⁾	0.019	0.023	$1.3 \cdot 10^{-3}$	$1.7 \cdot 10^{-3}$
N-Butyryl	2-Benzyl	-	-	-	-
N-Benzoyl	2-Benzyl	-	-	-	-
N-Benzoyl	2-Methyl	-	-	-	-

Tabelle 1: Synthetische, chemisch definierte Substrate der Neuraminidase; ⁺) nach Kuhn et al. (123) nicht spaltbar; ⁺⁺⁾ nach Meindl und Tuppy (142) spaltbar; ⁺⁺⁺⁾ Spaltungsgeschwindigkeiten in Enzymeinheiten (abgespaltene Menge NS (u Mol) pro Minute) (142); V.cholerae und Influenzavirus A-Neuraminidasen.

A. II. Überblick

Die Affinität der Neuraminidasen für α -Ketoside der NS scheint eher von der Art der Acylsubstitution der NS abhängig zu sein und nimmt von N-Acetyl- über N-Glykoly- zu N-Propionyl-NS deutlich ab (s. relative Spaltungsgeschwindigkeiten. Tabelle 1). Auch die oben beschriebene eingeschränkte Neuraminidase-Spaltbarkeit der N,O-Diacetyl-NS (64) ist nicht bedingt durch eine Eigenart des Aglykon, sondern tritt infolge der O-Substitution der NS auf. Weder das α -Ketosid der N-Butyryl- noch der N-Benzoyl-NS wird durch V.cholerae- oder Virusenzym angegriffen (s. Tab. 1). Dazu vermuten Meindl und Tuppy (142), daß offenbar eine sterische Behinderung der Neuraminidase durch allzu sperrige N-Acyl- bzw. N-Aryl-Reste verursacht wird.

Die Substratspezifität der V.cholerae-Neuraminidase ist gegenüber dem Influenzavirus-Enzym offenbar gering (142) (s. Tab. 1). In diesem Zusammenhang wurde kürzlich berichtet (57), daß das V.cholerae-Enzym die α -ketosidischen Bindungen der NS sowohl zwischen ihrem C₂ und dem C₆^I der Galaktose als auch zwischen ihrem C₂ und dem C₃^I der Galaktose im Trisaccharid Sialyllactose hydrolysieren kann, während Influenzavirus A nur die C₂ - C₃^I Bindungen angreift.

Neben der Substratspezifität ist die Abhängigkeit der Enzymwirkung von Calciumionen ein interessantes Unterscheidungsmerkmal einzelner Neuraminidasen. Einen Überblick über den Calcium-Ionenbedarf gibt Tabelle 2 (Kap. A. III. 1).

A. III. Vorkommen der Neuraminidase

1) Übersicht

Tabelle 2: Herkunft der Neuraminidasen und die Abhängigkeit ihrer Wirkung von Ca-Ionen (soweit beschrieben).

a) Myxoviren (11): von Ca^{2+} abhängig

- M. influenzae A (96) (134) (80)
- M. influenzae B (88) (94)
- M. parainfluenzae 1 (Sendaivirus, HämadSORPTIONSVIRUS Typ 2) (75)
- M. parainfluenzae 2 (54)
- M. parainfluenzae 3 (HämadSORPTIONSVIRUS Typ 1) (58)
- M. multiforme (Newcastle Disease, Atypische Geflügelpest) (32)
- M. pestis galli (Klassische Geflügelpest, Fowl Plague) (130)
- M. Parotidis (Mumpsvirus (126)

b) Bakterielle Mikroorganismen

	<u>Abh. v. Ca^{2+}</u>
Vibrio cholerae (33) (2) (162)	+
Clostridium perfringens (135) (47)	
(41) (46) (149) (60)	-
Clostridium tertium (100)	
Clostridium botulini (100)	
Diplococcus pneumoniae (47) (102)	-
Pseudomonas fluorescens	
Pseudomonas stutzeri (166)	
Pseudomonas aeruginosa (166)	
Corynebakterium diphtheriae (Toxin)	
(39) (103)	+
Lactobacillus bifidus, Stamm E (166)	
-Streptococci (124)	
Pasteurella pseudotuberculosis (124)	

c) Protozoen

- Trichomonas foetus (158)

A. III. Vorkommen der Neuraminidase

Tabelle 2 (Fortsetzung)

d) Vertebraten

Arten	Gewebe	Abhk.v. Ca ²⁺
Mensch (191)	Blut (Plasmaglyko- proteine, Cohn-Fraktion VI)	+
Rind (191)	Blut (Plasmaglyko- proteine, Cohn-Fraktion VI)	+
Huhn (5)	Embryo-Allantoismembran, mit dem Alter zunehmend.	-
(1)	Nicht - neurales Ektoderm.	-
Ratte (14)	Leber tumorkranker Tiere (Zunahme)	-
(43) (44)		
		<u>rel.Mengen⁺</u>
	lactierende Brust-	
	drüse	0.225 -
	Leber	0.125 +
	Gehirn	0.095 +
	Dünndarm	0.039 +
	Niere	0.034 +
	Milz	0.009 +
	Hoden	0.008 +
	ruhende Brustdrüse	0.010 -
(199)	(zusätzl.) in der	
	Lunge ca.	0.008
Maus (14)	Leber tumorkranker Tiere (Zunahme)	
Meerschweinchen		
(199)	rel.Mengen ⁺⁺) in: Niere 43, Leber 72, Milz 43, Gehirn 21, Lunge 16, Nebenhoden 22, Hoden 34.	
Kaninchen(199)	rel.Mengen ⁺⁺) in: Niere 40, Leber 41, Milz 52, Gehirn 32, Lunge 18, Nebenhoden -, Hoden 25.	

+) freigesetzte NS (uMol/g frischen Organ-
gewebes)

++) ug freigesetzte NS pro ml Organhomogenat.

A. III. Vorkommen der Neuraminidase

2) Erläuterungen

Wegen ihrer gemeinsamen Eigenschaften der Adsorption an Muco - (Schleim-, griech. "myxo-") Substanzen der Zelloberfläche und deren enzymatischer Veränderung wurden die RDE - Viren unter dem Namen Myxoviren zusammengefaßt (1).

Bei der Reaktion dieser Viren mit der Erythrocytenoberfläche lassen sich quantitative Unterschiede in der Abspaltung des Receptors zeigen, was zur Prägung des Begriffes "Receptorgradient" (33) führte. Dies kann am folgenden Beispiel erläutert werden: wenn eine bestimmte Erythrocytensuspension mit Mumpsvirus reagiert hat, so sind nach der Elution des Virus zwar die Rezeptoren für das Mumpsvirus abgebaut, jedoch können die gleichen Erythrocyten noch durch Influenza A- oder B-Virus hämagglutiniert werden. Läßt man dagegen eine Erythrocytenaufschwemmung der gleichen Species zuerst mit Influenza A-Virus reagieren, so wird durch die Reaktion mit diesem Virus nicht nur die Reaktionsfähigkeit mit Influenza A-Virus, sondern gleichzeitig auch mit Mumpsvirus aufgehoben. Wenn man schließlich zuerst die Erythrocytensuspension mit dem Virus der Schweineinfluenza zusammenbringt, so beseitigt man hiermit die Reaktionsfähigkeit mit sämtlichen anderen Myxoviren. Für den Receptorgradienten gibt es noch keine gesicherte Erklärung. Man nimmt an, daß er mit einer für jedes Myxovirus-Enzym typischen Substrataffinität oder mit der unterschiedlichen Virusoberfläche zusammenhängt.

Burnet stellte 1949 (38) Immunseren gegen V.cholerae-

A. III. Vorkommen der Neuraminidase

Neuraminidase her, indem er zur "Vakzine" Freund'sches Adjuvans gab und Kaninchen subcutan einspritzte. French und Ada 1954 (77) sowie Borecky 1958 (25) konnten aber zeigen, daß ein Adjuvans zur Stimulierung von Neuraminidase - Antikörpern nicht notwendig ist, wenn man genügend große Mengen an Enzym subcutan verabreicht. 1960 berichteten Madoff et al. (132), daß Antiseren gegen Neuraminidasen von *V.cholerae* und *D.pneumoniae* keine Kreuzreaktionen aufweisen, und daß diese ferner weder das Influenza PR8-Virus in seiner in vitro Reaktion mit Erythrocyten beeinflussen, noch umgekehrt hochaktive Antiseren gegen PR8-Virus bakterielle Enzyme beeinträchtigen. Demnach scheinen qualitative Unterschiede im Proteinaufbau der Neuraminidasen zu bestehen. Da aber die Antiseren nicht mit absolut reinen Neuraminidasen gewonnen wurden, besteht die Möglichkeit, daß ein großer Teil der Antikörper gegen die Fremdproteine der einzelnen Enzympräparate gerichtet waren, wodurch ihre Anti-Neuraminidase-Spezifität eingeschränkt wird.

In Kapitel A. II wurde schon angedeutet, daß die Neuraminidase im Myxovirus "partikelständig" ist, während die bakteriellen Neuraminidasen als "Exoenzyme" ins Kulturmedium abgegeben werden. Zur Präparation reinen Virusenzym ist es demnach notwendig, die Viruspartikel zu zerlegen, um ihren Enzymanteil freizusetzen (127). An *D.pneumoniae* konnten kürzlich Lee und Howe (125) zeigen, daß das Enzym in der Teilungsphase der Mikroorganismen ins Außenmedium abgegeben wird. Nach ihren Befunden ist jedoch nicht ganz auszuschließen, daß ein kleiner Teil des Enzyms erst bei

A. III. Vorkommen der Neuraminidase

der Autolyse der Zellen in Freiheit gesetzt wird.

Während die Neuraminidase das einzige Enzym ist, das bisher mit Sicherheit in Myxoviren nachgewiesen wurde, findet man in Kulturfiltraten von Bakterien, in Bakterienextrakten und besonders in Vertebratengeweben eine Vielzahl von Enzymen. Unter diesen seien die Enzyme hier behandelt, die in Biosynthese oder Abbau der Neuraminsäure eingreifen. N-ANS - Aldolase (E.C.4.1.3.3), ein zellständig gebundenes Enzym, das N-Acyl-Neuraminsäure in Brenztraubensäure und N-Acyl-D-Mannosamin aufspaltet, findet man außer in *Cl. perfringens* - (s. Kap. A. II.) (49) auch in *V. cholerae* - (50) und *E. coli* (Stamm K-235) - (50) Extrakten, ferner in entzündeten Geweben (72) und nach Tsvetkova (189) in vielen Vertebratengeweben, wo seine Konzentration derjenigen der Neuraminidase (s. Tabelle 2) zum Teil umgekehrt proportional ist. Während in *Cl. perfringens* und *V. cholerae* selbst keine Neuraminsäure nachgewiesen wurde — sie wird durch das Exoenzym Neuraminidase von Schleimsubstanzen der Kulturmedien abgespalten und vom Endoenzym N-ANS-Aldolase zerlegt —, produziert *E. coli* K-235 keine Neuraminidase, sondern außer N-ANS - Aldolase ein weiteres Enzym, "Sialyltransferase", welches die in der Bakterienzelle vorher mit Cytidin-Monophosphat aktivierte Neuraminsäure (N-ANS - CMP) zu Colominsäure polymerisiert (51). Die Colominsäure (s.a. Kap. A. II.) konnte schon vor Entdeckung dieses synthetisierenden Enzyms aus *E. coli* K-235 - Extrakten als reine Substanz isoliert werden (16). In Schweine- und Schaf-Submaxillarismucinen, menschlichen Erythrocyten,

A. III. Vorkommen der Neuraminidase

Brustdrüsen von Ratten, Ziegencolostrum und Gehirn von Schafen fand man ebenfalls Enzyme, die Neuraminsäure entweder abbauen, aktivieren oder auf Schleimsubstanzen übertragen (VIth Congress of Biochem., New York 1964) (52).

Nach Versuchen von Baba et al. (14) ist der Aktivitätsanstieg der Neuraminidase in der Leber tumor-kranker Mäuse und Ratten nicht durch hepatotrope Mikroorganismen oder Viren bedingt. Ihre Befunde lassen es vielmehr als möglich erscheinen, daß die Neuraminidasen der Säuger ähnlich wie das V.cholerae-Enzym (s. Kap. A. I.) adaptive Enzyme sind, "denn seit langem ist bekannt, daß im Blut von Krebspatienten ein Anstieg der kohlehydrathaltigen Proteine auftritt (170), und zwar infolge der Depolymerisierung von zerstörten Bindegewebsgrundsubstanzen sowie durch Destruktion der Tumormassen selber". Durch darin enthaltene Glykoproteine und Glykolipide wäre eine Stimulation der Neuraminidase in der Leber erklärbar.

An das erstmalige Auftreten der Neuraminidase in Wirbeltieren knüpfen Ada und Lind (5) die Vermutung, daß die Neuraminidase primär in tierischem Ektoderm enthalten ist und nach Virusinfektion der Zellen unter dem Einfluß des Virusgenoms in das Virus eingebaut wird. Dies sei wegen der zur eigenen Enzyymbildung u.U. zu geringen Menge an Ribonucleinsäure im Influenzavirus (6) zu erwägen; die unterschiedliche Abhängigkeit der "Membranneuraminidase" und der Myxovirus-Neuraminidase von Calciumionen spreche jedoch dagegen. Ferner waren Versuche, das Membran-

A. III. Vorkommen der Neuraminidase

enzym an Erythrocyten zu adsorbieren, ohne Erfolg. Die Autoren (5) erklärten dies damit, daß das Membranenzym eine geringe Affinität zur α -ketosidischen Bindung der N-ANS an das Galaktosamin im Erythrocytenstroma aufweist (5) (1).

A. IV. Biologische Eigenschaften Neuraminsäurehaltiger Substanzen und ihre Veränderung durch Neuraminidase.

Tabelle 3

NS-haltige Substanzen	Wirkung der Neuraminidase
<u>1) echte epitheliale Schleime</u>	
Sialyllactose aus Colostrum	Verlust der biologischen Wirkung als "Bifidusfaktor"
Mensch (118)	
Rind (161)	
Ratte (95) (183)	
N-ANS - N-Acetylgalaktosamin aus Submaxillarismucin	Spaltung der α -ketosidischen Bindung des Disaccharids
Rind (86)	
Schaf (85) (90)	
Ovarialcystenmucin (36)	Verlust der unspezifischen Hemmung der Virushämagglutination
Meconium, menschl. (118)	" "
Submaxillarismucine (93) (34) (109)	" "
Collocaliamucoid (eßbare Vogelnester, "swift let") (99)	
Harnmucin (53) (109) (179) (178)	geringfügige Verstärkung der Vit.B12-Bindungsfähigkeit (67)
Glykomakropeptid aus Casein durch Chymosinspaltung (81)	14 % NS, total abspaltbar
Intrinsic-Factor Mucoid aus Magenfundus (Mensch), Pylorusanteil (Schwein) (66)	angreifbar durch tryptische Darmenzyme (67), dadurch Reduktion der biologischen Wirkung als Vit.B12-Vehikel.
<u>2) Serum-Mucoide</u>	
<u>a) Globuline</u>	
Panagglutinin	Aktivitätsverlust (171)
"Francis Inhibitor" (10)	NS total abspaltbar, Verlust der Virushämaggl.-Hemmung

A. IV. Biologische Eigenschaften Neuraminsäure-haltiger Substanzen und ihre Veränderung durch Neuraminidase

NS-haltige Substanzen	Wirkung der Neuraminidase
α_1 -acid-glycoprotein (102) = Orosomucoid (45) Fetuin aus Kälberfeten (19)	NS-Abspaltung (102) Verstärkung der Reaktion mit Antikörpern des nativen, antigenen Fetuin (19)
Haptoglobin (Hp II,5 % NS)	Abspaltung von 70 % der NS (153).
<u>b) Proteohormone</u>	
Transferrin aus β_1 -Globulinfraktion (Mensch) (24)	in mehrere Fraktionen aufgespalten (24) (151), danach durch Galaktose-Oxydase angreifbar (155)
Thyreoglobulin	nur eines der vier Thyroxin-bindenden Globuline zeigt reduzierte electrophor. Bwglk. (24)
Erythropoietin aus Mensch (128), Schaf und Kaninchen (42)	Inaktivierung (128)
Follikelstimul.Horm (89)	97 % Inaktivierung (89)
Choriongonadotropin	Inaktivierung (29)
Menopausengon.-tropin (27)	80 % Inaktivierung nach Abspaltung von 60 % NS (82).
<u>c) Enzyme</u>	
Prothrombin (Mensch)	beschleunigte Umwandlung in Thrombin (Citratumwandlung) (163) (in vitro).
Serum-Cholinesterase	kein Einfluß auf Aktivität (13) (59); in vitro
Oxytocinase	kein Einfluß auf Aktivität (184); in vitro.
<u>3) Membranständige Mucioide</u>	
Erythrocytenstromata Mensch (101) (115) Rind (115)	Verlust der Virushämagglutinations-Hemmwirkung (101) (115), Inaktivierung der M- und N-Agglutinogene (15) (156) (157) (114) (115) (185) (186); geringe Verstärkung der Vit.B12-Bindung in vitro (67).

A. IV. Biologische Eigenschaften Neuraminsäure-haltiger
Substanzen und ihre Veränderung durch Neuraminidase

NS-haltige Strukturen	Wirkung der Neuraminidase
Erythrocyten	Aufhebung der Agglutinierbarkeit durch Myxovirus (172); Reduktion der zur Anode gerichteten Beweglichkeit (7) (92); Kaliumverlust und sphärocytose-ähnliches Aufquellen (104); Verminderung der Adsorptionsfähigkeit für Proteine in ionenarmen Lösungen (149).
Mensch (110)	Abspaltung von N-ANS; Verlust der M- u. N-Blutgruppenaktivität (168) (169) (133).
Rind (113)	Abspaltung von N-Glykoly-NS
Schaf u. Rind {173} (167)	Abspaltung des Receptors der heterogenetischen Mononucleose, trotzdem kein Verlust der Bindungsfähigkeit von Mononucleose Antikörpern (wahrscheinlich Colominsäure).
Huhn	Steigerung der Zellatmung (176) (175); verstärkte Hämolyse durch bakterielle Kulturfiltrate (175).
Thrombocyten (menschl.)	Erschwerung der Myxovirusbindung (104) (187)
Monocyten (menschl., peripheres Blut, A Rh) (192)	Erschwerung der Zelldeformierung; Aktivierung des Kontaktes mit - u. der Phagocytose von neg. gel. Partikeln
Eizelle (Kaninchen, Zona pellucida, unbefruchtet)	Erythrocyten-ähnliche Verformbarkeit; Hemmung des Spermien-durchtritts (167).
HeLa- und Fibroblasten B-Zellkulturen	Wachstumshemmung (65)
Fibroblasten von fetaler Rattenhaut u. Rindernierenrinde	Verminderung der Zellhaftung an der Glaswand, Wachstumshemmung (193).

A. IV. Biologische Eigenschaften Neuraminsäure-haltiger Substanzen und ihre Veränderung durch Neuraminidase

1) Die Glykoproteine

Die Neuraminsäure-haltigen Proteine lassen sich heute einer festen Stoffklasse, den Muco- oder Glykoproteinen (-Proteiden), zuordnen. Im Kohlehydratanteil dieser Proteine liegt die Acyl-Neuraminsäure immer endständig gebunden an D-Galaktose oder N-Acetylgalaktosamin, manchmal auch an ein anderes N-Acylneuraminsäure-Molekül gebunden, vor (Winzler 1960 (197)). Außer diesen Zuckern enthält der Kohlehydratanteil noch in jeweils unterschiedlichen Mengen D-Mannose, D-Fucose und N-Acetylglucosamin. Der charakteristische Bestandteil im mehr oder weniger kompliziert zusammengesetzten Oligosaccharidanteil der Glykoproteine ist die N-Acylneuraminsäure, die beim Menschen (mit Ausnahme der AB-Blutgruppensubstanz) bisher überwiegend als N-ANS (Winzler 1960 (197)) gefunden wurde. Glykoproteine werden nachgewiesen und gewonnen aus Organen epithelialen Charakters (Ekto- oder Entoderm); spaltet man sie durch proteolytische Fermente, so erhält man kleinere Peptid-Oligosaccharideinheiten (69). Im Gegensatz zu den Glykoproteinen stehen als eigene Stoffklasse die Mucopolysaccharide, deren saurer Charakter nicht durch Neuraminsäure, sondern durch Uronsäuren als determinierende Substanz bestimmt wird. Diese bilden mit anderen Zuckern, z.B. Hexosamin, in sich wiederholenden Disaccharideinheiten relativ lange Saccharidketten, die an ein meist kleines Protein angeheftet sind. Die Mucopolysaccharide werden aus Binde- und Stützgeweben von Organen gewonnen und sind mesenchymalen Ursprungs (69).

Anm.: Über Untersuchungen, die die quantitative Spaltbarkeit von Glykoproteinen durch Neuraminidase betreffen, s. Kap. A. II. 3.

A. IV. Biologische Eigenschaften Neuraminsäure-haltiger Substanzen und ihre Veränderung durch Neuraminidase

2) Die Ganglioside

Glykolipide mit Neuraminsäure-haltigem Oligosaccharid-anteil bezeichnet man als Ganglioside (Klenk 1941 (106)). Sie haben nach Klenk et al. 1964 (116) sowie Klenk et al. 1967 (121) folgende Struktur:

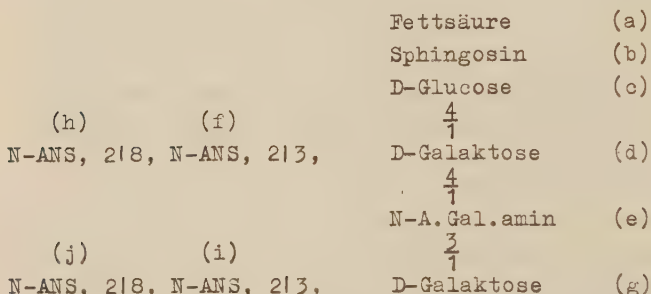


Fig. 2: N-Acetylneuraminsäure (N-ANS); N-Acetylgalaktosamin (N-A.Gal.amin); z.B. 4/1 bedeutet α -glykosidische Bindung zwischen C₄ des einen und C₁ des anderen Zuckers.

Erläuterung zu Fig. 2:

Das von Klenk 1941 (106) aus menschlichen Gehirnen bei amaurotischer Idiotie vom Typ Tay - Sachs extrahierte Gangliosid (s. Kap. A. II. 3) besteht nur aus dem Grundgerüst (a) bis (f). Die N-ANS (f) ist nicht Neuraminidase-spaltbar, weil ihre Position im Gesamtmolekül den Zugriff der enzymatischen Wirkgruppe verhindert (s. Kap. A. II. 3). Die übrigen, aus gesundem menschlichen Gehirn extrahierbaren Ganglioside, bestehen immer aus dem Grundgerüst (a) bis (g) und können darüber hinaus noch

A. IV. Biologische Eigenschaften Neuraminsäure-haltiger Substanzen und ihre Veränderung durch Neuraminidase

drei weitere N-ANS-Moleküle (h), (i) und (j) enthalten. Nur diese drei können von Neuraminidase abgespalten werden, während (f) wiederum aus sterischen Gründen der Enzymwirkung entzogen ist (Klenk et al. 1967 (117)). Bemerkenswert ist ferner, daß nur die N-ANS-Moleküle, die enzymatisch abspaltbar sind, auch durch 0.1 M NaJO_4 -Lösung bei pH 3.5 angegriffen werden (117).

3) Neuraminsäuregehalt und biologische Wirkung von Proteohormonen

Bei den nachfolgend genannten Hormonen handelt es sich ebenfalls um Glykoproteine. Was die Veränderung der biologischen Aktivität einiger Proteohormone sowie des Intrinsic Factor Mucoids betrifft, so wurde bisher nur bei letzterem die Inaktivierung nach Neuraminidaseeinwirkung sowohl in vitro (zwei Testverfahren) als auch in vivo (Urinexkretionstest nach Schilling (177)) überprüft (67). Dabei konnte zusätzlich gefunden werden, daß die N-ANS nur insoweit für die Funktion des Mucoids von Bedeutung ist, als sie den Mucoid-Vitamin B 12-Komplex auf seinem Weg vom Magen ins untere Ileum vor tryptischen Darmfermenten schützt.

Aus diesen Befunden und der Zusammenstellung in Tabelle 4 liegt die Annahme nahe, daß alle Proteohormone, deren N-ANS abgespalten ist, ähnlich dem Intrinsic-Factor Mucoid nicht vor proteolytischen Fermenten geschützt sind und deswegen in vivo inaktiviert werden. Auf der anderen Seite wäre die Hormonwirkung in vitro nicht beeinträchtigt, wenn entsprechende Testverfahren bekannt wären (Dukes: "Erythropoietin, Chemische Natur und biochemische Wirkungsweise", Mosbacher Kolloquium 1967).

A. IV. Biologische Eigenschaften Neuraminsäure-haltiger Substanzen und ihre Veränderung durch Neuraminidase

Biologisches System, Aktivität nach N-ANS-Abspaltung
in vitro in vivo

Intrinsic-Factor (66) (67)	+	-
Erythropoietin (128)	+	-
Transferrin (24) (151)	Galaktose- Oxydase- angreifbar (155)	-
Choriongonadotropin (29)	nicht meßbar	-
Menopausengen.-trop. (82)	nicht meßbar; zu 80% zerstört	
FSH (Follikelstimu- lierendes Hormon) (89)	nicht meßbar; zu 97% zerstört.	

Tabelle 4: Biologische Aktivität von Glykoproteinen in vitro und in vivo nach Abspaltung (enzymatisch) der enthaltenen Neuraminsäure.

A. V. Methoden zur Bestimmung der Neuraminidase-Aktivität

Um die Wirksamkeit eines Enzyms in vitro zu bestimmen, inkubiert man es unter Standardbedingungen mit seinem Substrat und mißt danach den Erfolg der Spaltung bzw. der Enzymwirkung, indem man entweder eine enzymatisch bedingte Veränderung im biologischen Verhalten des Substrates quantitativ erfaßt (indirekte Methoden) oder die Menge einer der beiden enzymatisch umgesetzten Substratanteile bestimmt (direkte Methoden).

Entsprechend den Kenntnissen, die man mit der Zeit über die Wirkungsweise der Neuraminidase erhielt, wurden zunächst indirekte und später direkte Methoden zur Bestimmung der Enzymaktivität entwickelt.

Zunächst bot sich als Substrat das rote Blutkörperchen an, dessen enzymbedingte Veränderung in der Aufhebung der Agglutinierbarkeit durch Myxovirus besteht und sichtbar gemacht werden kann (s. Kap. A. II. 1). Burnet und Stone 1947 (35) sowie French und Ada 1954 (77) benutzten die Erscheinung des Rezeptorgradienten der Myxoviren (s. Kap. A. III. 2) als Indikator für die Aktivität des RDE. Sie ließen Virus oder RDE in abgestuften Verdünnungen mit einer Standardmenge Erythrocyten bei 37°C reagieren, wuschen dann die Erythrocyten von Virus bzw. RDE frei und versetzten sie bei 4°C mit einem Gemisch verschiedener Myxoviren. Auf diese Weise läßt sich diejenige Virus- bzw. RDE-Verdünnung ermitteln, bei deren Reaktion mit den Erythrocyten gerade noch so viele Rezeptoren unversehrt bleiben, daß eine Hämagglutination sichtbar wird. Den Reziprokwert dieser Verdünnungsstufe setzt man als Maß

A. V. Methoden zur Bestimmung der Neuraminidase-Aktivität

für die enzymatische Aktivität ein (Titer).

Eine solche Grenzverdünnung des RDE läßt sich auch ermitteln, wenn man nach der Einwirkung von Enzym (Virus) einen einzigen Myxovirustyp oder dessen Indikatorart den Erythrocyten in ausreichender Menge beigibt. Der Reziprokwert der Enzym- (Virus-) Verdünnung, bei der die Erythrocyten gerade noch keine Agglutination mit dem "Indikatorvirus" zeigen, wird zur Aktivitätsangabe verwendet (68).

Eine dritte Methode dieser Art benutzt die enzymbedingte Panagglutinierbarkeit der Erythrocyten (s. Kap. A. II. 1) zur Bestimmung der Aktivität. Diejenige Virus- oder RDE-Verdünnung, deren Einwirkung auf die Standarderythrocyten gerade noch ihre Agglutination durch ein beliebiges Serum erlaubt, dient dabei als Maßeinheit (68).

Als 1955/56 die chemische Wirkungsweise des RDE als Neuraminidase bekannt wurde, ergab sich die Möglichkeit, die enzymatisch abgespaltene NS quantitativ mit dem Bial'schen Orcinreagens (145) zu bestimmen. Nach der Enzymreaktion werden die Proteine der Inkubationsmischung mit Phosphorwolframsäure (149) oder Benzoesäure in Chloroform (145) präzipitiert. Während man so die noch an Glykoproteine gebundene NS mit dem Protein ausfällt, so daß nur die enzymatisch freigesetzte NS in die Bial'sche Bestimmung eingeht, ist dies bei Gangliosiden, Oligosacchariden oder Glykoproteiden als Substraten nicht möglich.

A. V. Methoden zur Bestimmung der Neuraminidase-Aktivität

Seit 1959 steht eine Methode zur Bestimmung der freien NS auch in Anwesenheit glykosidisch gebundener NS zur Verfügung. Aminoff (9) und Warren (190) übernahmen die Perjodat-Thiobarbitursäuremethode, die von Weissbach und Hurwitz (195) zur Bestimmung von 2-Oxo-3-desoxyaldonsäuren verwendet wurde, und modifizierten sie für den Gebrauch als N-Acyl-NS - Bestimmungsmethode. Durch Perjodatoxydation der NS wird sehr wahrscheinlich β -Formylbrenztraubensäure gebildet, die ihrerseits zusammen mit 2-Thiobarbitursäure einen rotvioletten Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei 549 m μ gibt. Diese Farbverbindung kommt mit allen natürlichen NS-Verbindungen außer der 7-O-Acetyl-N-Acetylneuraminsäure zustande. Daraus ergibt sich, daß die unsubstituierte Hydroxylgruppe am C₇ der NS offenbar notwendig ist, damit sich bei der Perjodatexydation eine Carbonylgruppe am C₆ bilden kann. Nur aus dieser Form wird die C₆-Verbindung in β -Formyl-Brenztraubensäure und einen 2-C-Rest aufgespalten. Die 4-O-Acetylgruppe hingegen stört die Bildung der β -Formyl-Brenztraubensäure nur wenig und wird bei der Modifikation nach Aminoff (9) durch Kochen mit Thiobarbitursäurereagens bei pH 9.0 fast vollkommen abgespalten. Kuhn und Lutz konnten 1963 (122) unter Anwendung synthetischer β -Formyl-Brenztraubensäure zeigen, daß diese sehr wahrscheinlich mit dem farbbildenden Oxydationsprodukt der NS mit Perjodat übereinstimmt.

Eine dritte Methode zum direkten, chemischen Nachweis enzymatisch freigesetzter N-ANS und N-Glykoly-NS (N-GNS) entwickelten Comb und Roseman 1960 (50) sowie Brunetti et al. 1962 (30). N-ANS (oder N-GNS) wird

A. V. Methoden zur Bestimmung der Neuraminidase Aktivität

quantitativ durch N-ANS-Aldolase (s. Kap. A. II. 3 und A. III. 2) in Brenztraubensäure (BTS) und N-Acetyl-Mannosamin aufgespalten und die BTS anschließend durch Lactatdehydrogenase (LDH) zu Milchsäure reduziert. Für diese Reduktion wird Diphosphopyridinnucleotid als Protonendonator benötigt und dabei in seine oxydierte Form ($\text{DPNH} \rightarrow \text{DPN}^- + \text{H}^+$) überführt. Die Abnahme von reduziertem Diphosphopyridinnucleotid läßt sich bei 340 m μ als Änderung der optischen Dichte am Spektrophotometer messen. Sie ist proportional der Menge an gebildeter Milchsäure und steht somit auch in direkter Abhängigkeit zur Konzentration enzymatisch gespaltenen N-ANS. Sind zusätzlich O-Acetylgruppen in der N-Acyl-NS enthalten, so müssen sie erst durch Behandlung mit verdünntem Alkali bei 20°C abgespalten werden, da die O-acylierten NS durch Aldolase nicht angreifbar sind (50):

Die nach jeder dieser drei direkten Methoden ermittelte Neuraminidaseaktivität wird in Einheiten ausgedrückt, für die bisher allerdings keine Standardisierung gegeben wurde. Eine Einheit E ist die Menge Neuraminidase, die eine bestimmte Menge N-Acyl-NS (μg , bzw. $\mu\text{Mol} = 309 \mu\text{g}$ N-ANS) unter Standardbedingungen abspaltet.

Die in Tabelle 5 zusammengestellten Definitionen der Neuraminidaseeinheit sollen zeigen, daß ihr Vergleich aus Literaturangaben nicht möglich ist, da außer der Inkubationstemperatur von 37°C alle anderen Parameter der Spaltung von den einzelnen Autoren verschieden gewählt wurden.

Tabelle 5: Definitionen der Neuraminidaseaktivität
Inkubationstemperatur 37°C.

Enzym-Herkunft	1 E	Min.	pH	m Puffer	Substrat	Zusatz
V.cholerae (145)	1ug	15	6.4	0.1 Maleat-NaOH	Ery.-Stro-ma	0.02m CaCl ₂
(160)	1ug	60	6.6	0.01 Tris-acetat	Gangliosid	CaCl ₂
(4)	ug/to	Inter-valle	5.6	0.05 Tris-maleat	Sialyl-lactose	0.01M Ca, RSA
Cl.perfr. (149)	76ug	30	4.8	0.2 Acetat	Orosomucoid	
(41)	uMol	20	5.1	0.5 Na-acetat	Gangliosid	
(45)	uMol	1	4.5	0.1 K-acetat	Sialyl-lactose	75 ug RSA
(48)	uMol	30	5.1	0.1 Tris-maleat	Eiklar	
Membran (1)	uMol	1	4.5		Sialyl-lactose	RSA, Antibiotica
(26)	uMol	1	6.8		Harn-mucin	
D.pneumoniae (102)	0.1ug	30	6.5	Phosphat-Citrat	α_1 -Saures Glykoprot.	
Influenza A ₂ (164)	uMol	20	6.5	0.05 Phosphat	Sialyl-lactose	Ca ²⁺
C.diphtheriae (103)	muMol	30	Opt.	Acetat, Maleat	Transferrin, Orosomucoid	Ca ²⁺

Tab.5: RSA-Rinderserumalbumin; m=molare Lösung; M = Mol; ug/to = abgespaltene Menge N-ANS einer zeitabhängigen Spaltungsreihe gegen t=0 extrapoliert ("Anfangsgeschwindigkeit" der enzymatischen Spaltung); Orosomucoid=Serum-Glykoprotein.

A. VI. Stabilität der Neuraminidase

Ein spezifischer Hemmstoff der Neuraminidasereaktion konnte bisher nicht gefunden werden (68). Dagegen ist seit langem eine reversible Hemmwirkung durch Calcium- oder andere zweiwertige Ionen auf diejenigen Neuraminidasen bekannt, die in ihrer enzymatischen Reaktion von ihnen abhängig sind. Boschman und Jacobs berichten 1965 (26) über den Einfluß von Aetylendiamintetraessigsäure (EDTA) auf sechs Neuraminidasen verschiedener Herkunft: die Influenzavirusenzyme (intakte Viren) A₂-305 (1957 Japan), A₁FM₂ (1947 USA) und B33 (1958 Johannesburg), die Enzyme aus V.cholerae- und C.diphtheriae-Kulturfiltraten (partiell gereinigt) und das ungereinigte Membranenzym nach Ada und Lind (5). Die Autoren stellten fest, daß die Enzymaktivitäts-Hemmung, die infolge der Komplexbildung der Calciumionen mit EDTA eintritt, für jede der genannten Neuraminidasen verschieden stark ausfällt. Durch Dialyse des Calcium-EDTA Komplexes oder durch Zugabe von Calciumionen im Überschuß können die Enzyme teilweise oder vollständig reaktiviert werden; die einmal mit EDTA behandelten Neuraminidasen erwiesen sich als relativ hitzeempfindlich.

Vibrio cholerae-Neuraminidase

Bei den Versuchen, mit EDTA inaktiviertes Enzym zu reaktivieren, fanden Rosenberg et al. 1960 (160), daß Mangan- und Cobaltionen dazu in gleichem Maße brauchbar sind wie Calciumionen, und daß Cadmium- und Magnesiumionen das Enzym zu 29 % reaktivieren können, Bariumionen dagegen keine Wirkung haben.

A. VI. Stabilität der Neuraminidase

Eine irreversible Inaktivierung verursachen Eisen II- oder Quecksilberionen, Jodacetat und Arsenit, während Blei II-Ionen zur Inaktivierung um 50 % führen. Die Autoren nehmen an, daß die zur vollen Entfaltung der enzymatischen Aktivität wirksamen zweiwertigen Kationen als Liganden zwischen einer Carboxylgruppe des Enzyms und derjenigen der glykosidisch gebundenen Acyl-NS fungieren.

Luftsauerstoff und Schwermetallspuren verursachen einen raschen Abfall der Aktivität hochgereinigten Enzyms nach Mohr und Schramm 1960 (145). Mohr (144) nimmt an, daß die hochgradige Sauerstoffempfindlichkeit reinen Enzyms nicht so sehr durch Sulfhydrylgruppen im Enzymprotein bedingt sei, sondern eher, daß durch Oxydation von Aldehydgruppen die Aktivität verloren gehe; denn typische SH-Reagentien wie Jodacetamid und p-Chlormercuribenzoat hemmen nur zu 20 %.

Die Frage nach der Hemmbarkeit der Neuraminidase aus *V.cholerae* durch N-ANS selbst prüfte Mohr 1960 (144) und fand, daß erst nach Zugabe eines 20-fachen Überschusses an N-ANS zur Enzymreaktion eine Hemmung um 62 % eintritt. Sie deutete dies als kompetitive Hemmung: die freie NS besetzt das aktive Zentrum des Enzyms, so daß die Bildung eines Enzym-Substrat Komplexes verhindert wird. Nach Befunden von Walop et al. 1960 (188) kann es unter physiologischen Bedingungen durch N-ANS nicht zu einer vollständigen Hemmung des *V.cholerae* Enzyms kommen, da im Substrat — z.B. Sialyllactose — die ketosidische Bindung zwischen N-ANS und Lactose eine acht mal größere Affinität zum Aktiv-

A. VI. Stabilität der Neuraminidase

zentrum des Enzyms besitzt als die freie Neuraminsäure.

Reines *V.cholerae* Enzym ist nach Mohr und Schramm (145) nur unter Zusatz von Kaliumcyanid oder Rinderserumalbumin stabil, weil damit etwaige Schwermetallspuren gebunden und der Wirkung auf das Enzym entzogen werden. Auch in konzentrierter bzw. kristallisierter Form bleibt die Enzymaktivität bei niedrigen Temperaturen stabil. Ada et al. (4) konnten die Aktivität ihres reinen *V.cholerae* Enzympräparates in gefriertrockneter Form im Vakuum bei 0°C oder als Kristallsuspension in Wasser bei 0°C erhalten und stellten nach einigen Wochen sogar eine leichte Zunahme fest.

Der Aktivitätsverlust, der während der Reinigungsprozeduren bei Rosenberg et al. (160) eintrat, ließ sich durch Zufügen von Versenat (EDTA), Dialyse und anschließender Zugabe von Calciumionen vollständig beheben. Die Autoren erreichten durch bloßes Einfrieren oder Gefriertrocknung ihres reinsten Präparates eine Stabilisierung des Enzyms.

Cl.perfringens Neuraminidase

Erste Erfahrungen mit hochgereinigtem Enzym aus *Cl.perfringens* machten Cassidy et al. 1962 (46) und 1965 (45). Sie berichten (45) über einen rapiden Aktivitätsschwund hochgereinigter Präparate, der sogar in Gegenwart von Substrat (gewöhnlich Sialyllactose) anhielt, wenn das Enzym nicht während der Inkubation mit Substrat durch Rinderserumalbumin geschützt wurde.

A. VI. Stabilität der Neuraminidase

Das Serumalbumin schützt das Enzym auch teilweise vor Inaktivierung durch Einfrieren und Auftauen. Rohenzympräparate dagegen sind auch ohne Albuminzusatz stabil. In verdünnter Lösung geht die Aktivität des reinen Präparates schnell verloren; unter Albuminschutz tritt kein Aktivitätsverlust ein - aber auch keine Zunahme -; unter Aufbewahrung in konzentrierter Form erfährt die Aktivität innerhalb von zwei bis drei Jahren eine Zunahme um das 15 - 20 fache. Auch Rohenzym nimmt in diesen Zeiträumen im gleichen Ausmaße an Aktivität zu (45).

Setzten Cassidy et al. (45) zur enzymatischen Spaltung von 0.5 μMol Sialyllactose durch Cl.perfringens Enzym bis zu 1 μMol freie N-ANS hinzu, so konnten sie keine Beeinträchtigung der enzymatischen Spaltung beobachten. Burton (41) zeigte, daß Cl.perfringens Rohenzym im pH-Bereich von 5 - 9 eine Erhitzung auf 50°C während 60 Sec. ohne Aktivitätseinbuße übersteht.

MgSO_4 und MnSO_4 haben keine Wirkung auf das ungereinigte Enzym (135), während FeCl_3 eine irreversible Inaktivierung verursacht (149). Das Enzym zeigt auch ohne Zugabe von Ca^{2+} Ionen die volle Aktivität, ist aber möglicherweise gerade dadurch so außerordentlich empfindlich.

D.pneumoniae Neuraminidase

Für diese Neuraminidase fanden Hughes und Jeanloz 1964 (102) vollständige Inaktivierung durch HgCl_2 ,

A. VI. Stabilität der Neuraminidase

Teilinaktivierung durch CaCl_2 (10 %) und Manganacetat, und keinen Einfluß von EDTA, MgCl_2 oder NaCl. Sie berichten außerdem, daß das gereinigte Enzym eine Stunde lang bei 37°C in Pufferlösungen von pH 5.6 bis 8.0 tagelang stabil ist, daß aber bei 55°C in den ersten fünf Min. 10 % und anschließend innerhalb 15 Min. weitere 70 % der Aktivität verlorengehe.

Eine leichte Aktivierung des Enzyms wird durch Zugabe von Cystein oder KCl erreicht.

C.diphtheriae Neuraminidase

Gereinigte Neuraminidasen des C.diphtheriae - Toxin und - Toxoid werden nach Jamieson 1966 (103) nicht beeinträchtigt durch Jodacetamid, KCN, Mn- oder Mg-Ionen (0.01M), werden jedoch vollständig gehemmt durch Cu^{++} -, Fe^{++} -, Fe^{+++} -Ionen sowie durch 8-Hydroxychinolin (10^{-5}M). Eine Hemmung von 60 % verursachen Zn^{++} -Ionen (0.01M). Zugabe von 1 M NaCl hemmt zu 65 %, von 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zu 40 %; die Aktivität könnte jedoch in beiden Versuchen nach Entfernung der Salze durch Dialyse wiedergefunden werden. p-Chlormercuribenzoat (10^{-5}M) und HgCl_2 ($2.5 \cdot 10^{-4}\text{M}$) verursachen eine Aktivitätssteigerung um 10 - 20 %. Zugabe von Ca^{++} in optimaler Konzentration von $1.5 \cdot 10^{-3}\text{M}$ führt zu einer Steigerung um 20 %, und zwar vor und nach Dialyse gegen EDTA (10^{-2}M). Im letzteren Fall wurde das Enzym erneut gegen Puffer zur Entfernung des Chelatbildner dialysiert. Zugabe von EDTA (10^{-3}M) zum

A. VI. Stabilität der Neuraminidase

eben dialysierten Enzym führt zunächst zur Hemmung um 50 %, jedoch kann die volle, stimulierte Aktivität nach Zugabe der äquimolaren Calciummenge zurück- erhalten werden.

Eine ähnliche, nicht lineare Hemmung durch EDTA fanden Ada et al. 1961 (4) für das V.cholerae Enzym sowie Boschman und Jacobs (26) bei allen von ihnen geprüften Neuraminidasen in unterschiedlichem Ausmaß.

Membran - Neuraminidase

Neuraminidase aus der Chorionallantoismembran von Hühnerembryonen ist nach Ada 1963 (1) durch Sulphydryl-reagentien vollkommen hemmbar; gibt man Cystein hinzu, so kann diese Hemmung teilweise beseitigt werden. Das Enzym ist in einer "Enzymprotein" - Konzentration von 2 - 3 mg/ml mehrere Wochen lang bei 0°C stabil. Proben davon wurden bei -20°C drei bis vier Monate ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt. Bei einer Konzentration von 0.025 mg Protein pro ml zusammen mit 1 mg Sialyllactose verliert das Enzym in 15 Min 50 % seiner Aktivität bei pH 5.8 und 37°C. Zugabe von Rinderserumalbumin (Endkonzentration 1 mg/ml) vermindert diesen Verlust auf 10 %. Stabilitätsprüfungen bei verschiedenen pH-Werten in Anwesenheit von Rinderserumalbumin und Sialyllactose enden nach 30 Min. Inkubation bei 37°C mit folgenden Aktivitätseinbußen: bei pH 8-6 von 5-10 %, bei pH 5 von 20 % und bei pH 4 von 25 %.

A. VII. Reinheitskriterien, Spaltungs- und Substanzcharakteristika und Reinigung der Neuraminidasen

Das Maß für den relativen Reinheitsgrad eines Enzympräparates ist seine spezifische Aktivität. Dazu wird die Enzymeinheit auf die Menge des jeweils enzymatisch wirksamen Proteins oder Protein-Stickstoffes bezogen. Da die meisten Autoren verschiedene Enzymheiten definieren (s. Kap. A. V. 2), ist ein Vergleich ihrer Reinigungsergebnisse untereinander nicht möglich. Jeder der in Tabelle 5 angeführten Autoren ist aber in der Lage, anhand seiner eigenen, standardisierten Bestimmungsmethode, den Erfolg eines jeden seiner Reinigungsschritte bei der präparativen Aufarbeitung des Rohmaterials bis zum reinsten Enzympräparat quantitativ zu erfassen. Je geringer der Protein- bzw. Stickstoffgehalt einer Enzymeinheit der Menge Enzym, die eine festgesetzte Menge (μg oder μMol) eines definierten Substrates gesetzt - wird, desto weniger Fremdprotein enthält das Präparat und desto reiner liegt das Enzym vor.

Weitestgehend gereinigt ist ein Enzym erst dann zu nennen, wenn seine spezifische Aktivität "E/mg Protein" nach mehreren, möglichst unterschiedlichen Reinigungsverfahren keine Zunahme mehr gezeigt hat. In diesem Falle wird die spezifische Aktivität zu einem Maß, das sich nicht mehr ändert und als ein Charakteristikum des Enzyms zu bezeichnen wäre. Das Enzymprotein sollte wenigstens eine oder besser mehrere der folgenden Bedingungen erfüllen: einheitliches chromatographisches und electrophoretisches Verhalten, einheitliche Sedimentation in der Ultrazentrifuge (gleichbleibendes Molekulargewicht) sowie Kristallisierbarkeit (s. Kap. A. I.).

A. VII. Reinheitskriterien, Spaltungs- und Substanzcharakteristika und Reinigung der Neuraminidasen

Wenn mehrere Arbeitsgruppen unabhängig voneinander gereinigte Enzyme gleicher Herkunft beschreiben, so sollten also, wenn es sich um reine Enzyme handelt, die enzymatischen Konstanten, die unter Anwendung eines gleichen Substrates gefunden werden, ebenso übereinstimmen, wie die physikalischen Eigenschaften des Enzymproteins. Daß dieses Ziel bei der Reinigung der Neuraminidasen noch nicht erreicht wurde, wird neben den in Kap. A. II. und A. VI. beschriebenen Ergebnissen aus den Literaturangaben deutlich, die in den Tabellen 6 und 7 zusammengestellt sind.

Das bisher einzige konstante und gesicherte Merkmal dafür, daß es zumindest zwei verschiedene enzymatische Wirkgruppen gibt, ist die unterschiedliche Abhängigkeit der Neuraminidasen von Calcium-Ionen (s. Tabelle 2).

Die anderen Unterschiede, die aus der Literatur hervorgehen (s. Tabelle 6 und 7) deuten zwar in dieselbe Richtung, büßen jedoch erheblich an Beweiskraft ein, da auch für Neuraminidasen gleicher biologischer Herkunft unterschiedliche Eigenschaften gefunden wurden. Es liegt nahe, diese in gewissem Maße als "präparatspezifisch" anzusehen (s.a. Kap. A. VIII.).

A. VII. Reinheitskriterien, Spaltungs- und Substanzcharakteristika
und Reinigung der Neuraminidasen

Tabelle 6

Enzym	Substrat	K_M	pH-Opt.	Puffer
V.cholerae (kristallin)	menschl.Harn- mucin		6.0-8.0 u. 4.5-5.0	Essigsre.- Acetat Phosphat
50 000-fach gereinigt (145)	Rindersubmaxill.- mucin Kälbererystroma	$2 \cdot 10^{-4}$	6.5 6.5	Phosphat Phosphat
V.cholerae (kristallin)	Rindergehirn- Gangliosid	$4.1 \cdot 10^{-2}$	6.6-6.9 u. 5.4-5.9	Tris-Acetat
30 300-fach gereinigt (160)				
V.cholerae (kristallin)	Sialyllactose	$1.2 \cdot 10^{-3}$	5.6, 4.9 ohne Ca^{++}	Tris-Maleat
ca. 1000-fach gereinigt (4)	Sialyllactose u. Colominsre.		5.0	Acetat
Cl.perfringens ("Rohenzym") (149)	Orosomucoid		5.0-5.5	Acetat
Cl.perfringens ("Rohenzym") (41)	Gangliosid Sialyllactose	$4 \cdot 10^{-4}$ $4 \cdot 10^{-4}$	5.1	Na-Acetat und K-Phosphat

A. VII. Reinheitskriterien, Spaltungs- und Substanzcharakteristika und Reinigung der Neuraminidasen

Forts. Tabelle 6

Enzym	Substrat	K_M	pH-Opt.	Puffer
Cl.perfringens 1000-fach gereinigt (45)	Rinder- Sialyllactose	$2.4 \cdot 10^{-3}$	4.0-4.8 ca. 5.6	Acetat Citrat-Phosphat u. Maleat
"Membranenzym" ca. 525-fach gereinigt (1)	Sialyllactose Fetuin Schaf-Submax.- mucin	$6.4 \cdot 10^{-4}$ $16.6 \cdot 10^{-4}$ $18.2 \cdot 10^{-4}$	4.0-4.5 4.1 4.0-5.2	Acetat Acetat Acetat
D-pneumoniae 450-fach gereinigt (102)	Sialyllactose α_1 -acid-glyco- protein	$18 \cdot 10^{-4}$ $3.5 \cdot 10^{-4}$	6.5 6.5	Trisacetat u. Phosphat-Citrat
C.diphtheriae- Toxin (103)	Transferrin Orosomucoid	$2.7 \cdot 10^{-8}$ $3.1 \cdot 10^{-8}$	6.2 6.0	Tris-Maleat Tris-Maleat
-Toxoid (103)	Transferrin Orosomucoid	$1.5 \cdot 10^{-7}$ $1.4 \cdot 10^{-7}$	4.8 4.8	Acetat Acetat
V.cholerae (103)	Transferrin Orosomucoid	$4.7 \cdot 10^{-8}$ $4.0 \cdot 10^{-8}$	5.4 6.2	Tris-Maleat Tris-Maleat
Influenza PR8 (154)	N-ANS-Lactose Orosomucoid Haptoglobin Harnmucin	$1.2 \cdot 10^{-3}$	7.0 5.4-5.5 5.7-5.8 6.3	Phosphat Phosphat Phosphat Phosphat

Tabelle 6: Zusammenstellung von Neuraminidase-Charakteristiken aus der Literatur, ermittelt mit Neuraminidasen unterschiedlicher Herkunft und verschiedenen Substraten.

A. VII. Reinheitskriterien, Spaltungs- und Substanzcharakteristika und Reinigung der Neuraminidasen

Tabelle 7: Zusammenstellung von Literaturangaben über die Molekulargewichte einzelner Neuraminidasen. S = Sedimentationskonstante der Ultrazentrifugation; Gelfiltrationsmethode zur Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinen.

Enzym	Mol.Gew.	S bei	pH	Gelfiltration
(145) V.cholerae	8 000	1.3 2.3-1.3	8.5 5.5	
(160)	"unter 10 000"	1.0	6.6	
(4)	90 000	5.3 5.5	8.5 6.7	
(1) Membranenzym	"niedrig"	3.3	7.8	Sephadex G-75
(102) D.pneumoniae	100 000			Seph. G-100
(125)	"vielleicht unter. 10 000" +)			
(103) C.diphtheriae	100 000			Seph. G-200
(192)	50 000			
(165) Infl.Virus A ₂	nicht angegeben	8.8	6.5	
(146)	B "	9.0	6.5	

+) Vermutung aufgrund serologischer Beobachtungen (125).

Die Reinigung der Neuraminidase unter Ausnutzung ihrer spezifischen Reaktion mit dem Receptor (Fixierung des Enzyms an ein Substrat, z.B. Erythrocytenstrome (35) (63)), die Schramm und Mohr 1959 (162) mit besonders gutem Erfolg anwandten, scheint in ihrer Wirksamkeit bisher unübertroffen zu sein. Sie ist jedoch als Methode technisch schwierig zu handhaben und erfordert

A. VII. Reinheitskriterien, Spaltungs- und Substanzcharakteristika und Reinigung der Neuraminidasen

bei anderen Neuraminidasen als dem V.cholerae-Enzym auch andere Versuchsbedingungen (103). Deshalb werden in jüngeren Arbeiten verschiedene präparative Verfahren, die zur Reinigung von Protein heute allgemein üblich sind, hintereinandergeschaltet und führen mitunter zu gleich guten Resultaten, soweit dies an der Zunahme der spezifischen Aktivität vom Rohenzym bis zum reinen Enzym ablesbar ist.

Für V.cholerae Neuraminidase z.B. fanden Rosenberg et al. 1960 (160) eine verblüffend einfache Methode: sie erhielten eine 30 300-fache Reinigung durch fünfmalige Präzipitation ihres enzymatisch aktiven Proteins mit Ammonsulfat unter verschiedenen Bedingungen sowie einer chromatographischen Reinigung an Diaethylamino-äthanol - (DEAE -) Cellulose.

Cassidy et al. konnten 1965 (45) über eine 5 500-fache Reinigung der Neuraminidase aus Cl.perfringens berichten, die sie durch Gelfiltration auf Sephadex G-75 und anschließende Chromatographie an DEAE-Cellulose erreichten. Dagegen berichtet Ada (1), daß seine Versuche, das Membranenzym an DEAE-Cellulose zu reinigen, sehr unbefriedigend verliefen, ebenso Jamieson (103) (D.diphtheriae).

Beobachtungen über verschiedene Molekulargewichte bzw. über das eigentümliche Verhalten mancher Neuraminidasen bei der Gelfiltration führten folgende Autoren zu der Vermutung, daß die Enzymmoleküle untereinander aggregieren können:

A. VII. Reinheitskriterien. Spaltungs- und Substanzcharakteristika und Reinigung der Neuraminidasen

Mohr und Schramm 1960 (145) V.cholerae-Neuraminidase,
Pye und Curtain 1961 (152) V.cholerae-Neuraminidase,
Cassidy et al. 1965 (45) Cl.perfring.-Neuraminidase.

Cassidy nahm ferner an, daß das Enzym aus *Trichomonas foetus* (158) aus demselben Grunde bei Chromatographie an DEAE-Sephadex in mehrere Fraktionen aufgetrennt werden konnte (45).

Eine zusätzliche Adsorption des Enzymmoleküls an andere Proteine (Fremdproteine) diskutieren:

Ada 1963 (1) Membranenzym
Seto und Hokama 1964 (164) Influenzavirus A₂
Hughes und Jeanloz 1964(102) D.pneumoniae-Neuraminidase.

Ada (1) gab ein Puffersystem an, mit dem eine Aggregation der Neuraminidase aus der Chorionallantoismembran mit Fremdprotein vermieden werden soll: 0.01 M EDTA - 0.01 M Phosphatpuffer pH 7.8 enthaltend 0.4 NaCl. Dieses System verwandten auch Hughes und Jeanloz (107) zur Gelfiltration ihres reinen Enzyms aus D.pneumoniae, konnten jedoch keinen Unterschied zu Ergebnissen der unter anderen Bedingungen ausgeführten Versuche feststellen.

A. VIII. Problemstellung

Da sich gerade in bezug auf die Neuraminidase aus Cl.perfringens in der Literatur die unterschiedlichsten und widersprüchlichsten, andererseits aber auch bisher geringsten, Angaben über Ca^{2+} -Ionenabhängigkeit der Wirkung, Molekulargewicht, Aufspaltbarkeit in verschiedene Fraktionen und Stabilität finden, schien eine weitere Untersuchung gerade dieses Enzyms besonders reizvoll. Erst im Laufe der experimentellen Arbeit wurde deutlich, wie schwierig das zuerst gesteckte Ziel der Kristallisierung reiner Neuraminidase aus Cl.perfringens zu erreichen ist. Das schwerwiegendste Hindernis ist die immense Anfälligkeit der gereinigten Neuraminidase gegenüber einer Vielzahl in ihrer Wirkung noch ungeklärter Faktoren (s. Kap. A. VI.). Ferner ist die Enzymkonzentration in Kulturfiltraten von Cl.perfringens so gering, daß 80-Liter-Ansätze zur Gewinnung einigermaßen faßbarer, gereinigter Enzymmengen beschrieben wurden (45). Während sich diese Schwierigkeit durch Erhöhung der Menge an Ausgangsmaterial, und im Falle des V.cholerae-Enzyms zusätzlich durch eine Stimulierung der Enzymproduktion umgehen läßt, indem man Substrate oder NS selbst zum Kulturmedium hinzufügt (3), setzen die zur Reinigung erforderlichen chromatographischen Verfahren der Ausbeute des Einzelversuches eine weitere Grenze. Ferner stellt sich aus der Eigenart der Neuraminidase, mit anderen Proteinen aber auch mit gleichen Enzymmolekülen Aggregate scheinbar höheren Molekulargewichtes zu bilden (s. Kap. A. VII.), die Aufgabe, solche Aggregatbildungen zu verhindern oder wieder zu lösen (1), was meist mit weiteren Verlusten an aktivem Enzym verbunden ist. Der Reinheitsgrad von verschiedenen

A. VIII. Problemstellung

Präparaten unterschiedlichen Molekulargewichtes (Tabellen 6 und 7) ist deshalb auch schwierig zu beurteilen. Man kann nämlich nicht sicher entscheiden, ob es sich dabei um Aggregate reiner Enzymmoleküle oder um deren Adsorbate an Fremdprotein handelt.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche führten nicht zur Kristallisation eines reinen Cl.perfringens-Enzyms, erlaubten es aber, die Aggregat- bzw. Adsorbatbildung der Neuraminidase aus Cl.perfringens näher zu untersuchen, ihr Molekulargewicht wenigstens annähernd festzulegen, einen weiteren Weg zur Reindarstellung des Enzyms aufzuzeigen, die Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von Calciumionen zu prüfen und schließlich zur näheren Charakterisierung eines synthetischen Substrates des α -Benzylglykosids der N-Acetylneuraminsäure (Faillard und Blohm (71)) beizutragen.

B. I. Methoden

1) Bestimmung der Neuraminidase-Aktivität

Prinzip: Bestimmung der unter Standardbedingungen (s.u.) enzymatisch freigesetzten N-ANS.

Substrat: Gangliosidgemisch aus normalem, menschlichem Gehirn
(2.8 mg Rohgangliosid pro ml, davon
11.7 % = 0.328 mg N-ANS enzymatisch abspaltbar (190)).

Bestimmung der freigesetzten N-ANS: Perjodat-Thiobarbitursäure - Methode nach Aminoff (9).

Enzymeinheit: 1 E (Enzymkonzentration) spaltet 1 μ g N-ANS in 15 Min. bei 37°C und pH 4.9 - 5.0 von 2.8 mg Gangliosid pro ml Pufferlösung ab.

Spezifische Aktivität: Enzymeinheiten bezogen auf 1 mg Protein (E/mg Prot.), Methode s. Kap. B. I. 3.c).

Relative Enzymmengen in den Einzelfraktionen säulenchromatographischer Versuche (s. Kap. B. III. und IV.) werden nicht in Einheiten E angegeben: nach einer jedem Einzelversuch angepaßten besonderen Methode werden Minimum und Maximum der Enzymelution ermittelt (Enzymaktivitäten der Einzelfraktionen in Diagrammen gegen Elutionsvolumina aufgetragen).

Folgende Parameter für jeden Versuch besonders festgelegt: Spaltungszeit (bis zu 1 h),
zur Bestimmung eingesetzte Menge 0.01 - 0.25 ml je Fraktion des Säuleneluates,
Substratkonzentration pro Inkubationsgemisch und Versuch.

B. I. Methoden

1.a) Reagentien zur Bestimmung der Enzymeinheiten

Ist die Enzymkonzentration in der Ausgangslösung sehr hoch, so zunächst Herstellung einer Enzymverdünnung, damit die in 15 Min. enzymatisch freigesetzte N-ANS möglichst in den für die Aminoffbestimmung (9) optimalen Konzentrationsbereich von 3-15 μg gelangt (Extinktionen von ca. 0.1 - 0.5 bei 546 $\text{m}\mu$): z.B. 0.2 ml Enzymlösung ad 10 ml H_2O = 50-fache Verdünnung.

Aus dieser Stammverdünnung anschließend drei bis vier Proben in Form einer Potenzreihe von 2 verdünnen.

Zur Bestimmung der Aktivität gereinigten Enzyms folgende Verdünnungsmethode (schematisch):

0.25 ml aus S^+	zu 0.25 ml H_2O	= 0.5 ml (a)
0.25 ml aus S	zu 0.75 ml H_2O	= 1.0 ml (b)
0.25 ml aus S	zu 1.75 ml H_2O	= 2.0 ml (c)

$^+$ Stammverdünnung

Von jedem Gemisch (a) bis (c) werden 0.25 ml zur Enzymbestimmung entnommen. Sie enthalten die Enzymlösung der Stammverdünnung in (a) 2-facher, (b) 4-facher und (c) 8-facher Verdünnung.

Standard-Substratlösung zur Bestimmung der Enzymaktivität: In 10 ml eines 0.2 m Kaliumacetatpuffers pH 4.9 - 5.0 sind 28 mg Gangliosid (enthaltend 3.28 mg (11.7 %) enzymatisch abspaltbarer N-ANS, s.u.) und 6 mg Rinderserumalbumin (a grade, Calbiochem) gelöst.

Standard-Inkubationslösung: total 0.5 ml bestehend aus 0.25 ml wässriger Enzymlösung (-verdünnung) und 0.25 ml

B. I. Methoden

der Standard-Substratlösung. Dieses Gemisch ist 0.1 M an Kaliumacetat, enthält 700 µg Gangliosid bzw. 82 µg enzymatisch abspaltbarer (Warren (190), s.u.) N-ANS und 150 µg Rinderserumalbumin.

Hierzu wurden die Angaben von Cassidy et al. (45) mit Ausnahme des pH-Wertes (pH 4.5 (45)) und des Substrates (Sialyllactose, enthaltend 2 µMol = 618 µg N-ANS in 0.5 ml (45)) übernommen. Der nur geringgradig höhere pH-Wert von 4.9 - 5.0 wurde gewählt, weil er noch im Maximumbereich des von den Autoren ermittelten pH - Optimum für Cl.perfringens - Neuraminidase liegt und die von den gleichen Autoren (45) beschriebene Abnahme der Enzymaktivität während der Bestimmung nach eigener Erfahrung zum Teil auf das saure Milieu zurückgeführt werden kann (s.a. Kap. A.VI.).

Die gewählte Gangliosidkonzentration ist hinsichtlich der zu erwartenden Maximalmenge an freier N-ANS (82 µg N-ANS pro Inkubationsgemisch) der N-ANS-Bestimmungsmethode nach Aminoff angepaßt. Sie stellt einen 5 - 6-fachen Substratüberschuß dar, weil die zur Bestimmung der Enzymeinheiten benutzten Abspaltungsergebnisse nicht höher als 15 µg pro Inkubationsgemisch liegen.

1.b) Methode nach Aminoff (9) zur Bestimmung freier N-Acetylneuraminsäure (N-ANS).

Prinzip: s. Kap. A.V.1.

2-Thiobarbitursäure von Merck AG, Darmstadt, löst sich nur sehr schlecht in 0.1 N NaOH-Lösung. Sie wurde daher zuerst gegen 40°C - warmes H₂O dialysiert und anschließend zu einem gut wasserlöslichen Pulver lyophilisiert.

Die Methode ist zur Bestimmung von 3 - 30 µg N-ANS ausreichend. Enthält eine Probe mehr als 30 µg N-ANS, so wird das mit dem Thiobarbitursäurereagens erhaltene Chromogen in 10 ml HCl-Butanol (9) ausgeschüttet (Modifikation) und, um bei der Ablesung der Extinktion (546 mµ) in einen Bereich von 0.1 bis 0.8 zu gelangen, entsprechend weiter mit HCl-Butanol verdünnt.

B. I. Methoden

Für die Bestimmung derart großer Mengen N-ANS, wie sie bei den Versuchen zur Ermittlung der Michaeliskonstanten (Kap. B. IV. 3. b) anfallen, bot die zuletzt genannte Modifizierung die einzige Möglichkeit. Dabei erwies sich die für 2 - 145 μg N-ANS ermittelte Eichkurve in ihrem Verlauf als linear, so daß ein konstanter Faktor F zur Umrechnung der gefundenen Extinktionen bei 546 μm in μg N-ANS verwendet werden konnte: Extinktion $\cdot$ Faktor = N-ANS.

Aufstellung einer Eichgeraden zur Ermittlung des Faktors F:

Synthetische N-ANS⁺ 24 h bei 60°C über P_2O_5 getrocknet; Verdünnungen mit H_2O in der Potenzreihe von 2.

Einwaage N-ANS in H_2O gelöst	N-ANS-Konzentration/0.5 ml	Ext. 546 Doppelbestimmungen	Aminoff
1.515 mg/25 ml	3.788 μg	0.125	0.128
"	7.575 μg	0.251	0.256
"	12.12 μg	0.411	0.405
"	15.5 μg	0.518	0.525
"	21.21 μg	0.806	0.740
"	30.3 μg	1.019	0.976
2.90 mg/10 ml	116.0 μg	3.792	3.980
"	145.0 μg	4.837	4.920
2.12 mg/10 ml	42.4 μg	1.427	1.45
"	53.0 μg	1.802	1.765
"	63.6 μg	2.09	2.105
"	84.6 μg	2.863	2.798
"	106.0 μg	3.493	3.529

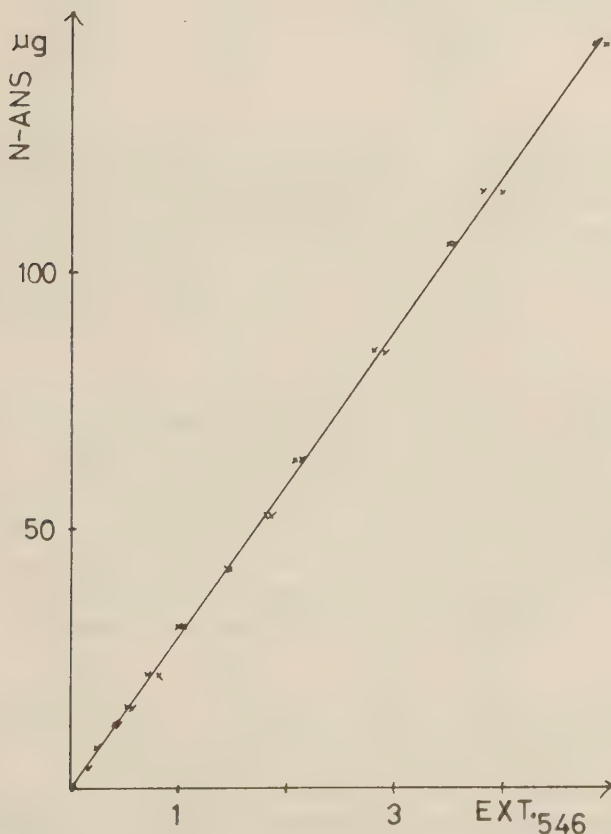
Tabelle 8: Thiobarbitursäuremethode nach Aminoff, Werte zur Aufstellung einer N-ANS - Eichkurve (s. Fig.2).

Nach Regressionsrechnung dieser Extinktionswerte wird eine Gerade (s. Fig 2) gezeichnet, die eine lineare

⁺ von Dr. G. Kirchner im Institut für Physiologische Chemie der Ruhr-Universität Bochum synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

B. I. Methoden

Abhängigkeit zwischen $\mu\text{g N-ANS}$ und Ext._{546} erkennen
läßt. Danach ist $\text{Ext.}_{546} \cdot 29.8 = \mu\text{g N-ANS}$.



Figur 2: Thiobarbitursäuremethode nach Aminoff. Eichkurve mit Einwaagen synthetischer N-ANS (s. Tab. 8).

B. I. Methoden

1.c) Ausführung der Aktivitätsbestimmung

Zu je 0.25 ml Enzymverdünnung 0.25 ml Standardsubstratlösung bei 37°C zugeben; nach genau 15 Min. durch Zugabe von Perjodsäurereagens (Aminoff (9)) enzymatische Reaktion unterbrechen und freigesetzte N-ANS bestimmen (Kap. B. I. 1.b).

Leerwerte: Bei der Bestimmung der Rohenzymaktivität (gelbbraun gefärbte Lösungen) 0.25 ml Standardsubstratlösung und 0.25 ml der entsprechenden, hitzeinaktivierten (2 Min. im kochenden Wasserbad) Enzymlösung (-verdünnung).

Bei Bestimmung gereinigter, farbloser Enzymlösungen: 0.25 ml Standardsubstratlösung mit H₂O ad 0.5 ml.

Leerwerte in allen Phasen der enzymatischen Aktivitätsbestimmung wie enzymhaltige Proben behandelt, ergeben etwas Chromogen mit dem Thiobarbitursäurereagens (Aminoff (9)), wahrscheinlich infolge einer hydrolytischen N-ANS-Abspaltung durch das Perjodsäurereagens (Aminoff), pH 1.2 (117) (s.a. Kap. A.IV.2: Ganglioside). Dieser "Verfahrensleerwert" dient als Vergleichswert bei der Ablesung der Extinktionen enzymhaltiger Proben.

Beispiel 1:

Aktivitätsbestimmung einer Rohenzymlösung; Verdünnungen direkt aus der Lösung in einer Potenzreihe.

$$E/ml = \text{Ext.}_{546} \cdot F \cdot 4 \cdot 2^n,$$

wobei $F = 29.8$, 2^n = Verdünnungsfaktor pro ml Ausgangslösung und 4 = Umrechnungsfaktor von 0.25 ml zur Bestimmung eingesetzter Enzymlösung auf 1 ml Ausgangslösung bedeuten.

B. I. Methoden

Ext. ₅₄₆	F = ug N-ANS	n	E/ml
0.509	15.2	1	121.5
0.515	15.3	2	244.5
0.520	15.5	3	496
0.508	15.1	4	966
0.483	14.4	5	1843
0.467	13.9	6	3560
0.380	11.3	7	5780
0.248	7.4	8	7580
0.108	3.2	9	6550

Tabelle 9: Enzymverdünnungsreihe 2^n mit Standard-substratlösung inkubiert. Ermittlung E/ml Ausgangslösung: zwischen Ext.₅₄₆ 0.1 und 0.4 bleiben E/ml annähernd konstant; der höchste dieser Werte wird als der Aktivität entsprechend angenommen: im Beispiel 7580 E/ml.

Beispiel 2:

Aktivitätsbestimmung einer gereinigten Enzymlösung.

$$E/ml = \frac{Ext. \cdot F \cdot S}{546 \cdot 4n},$$

wobei S-Verdünnungsfaktor der Stammverdünnung und n=Einzelverdünnungsfaktor bedeuten.

Stammverdünnung : 0.2 ml Ausgangsenzymlösung ad 10 mlH₂O;
S = 50.

Einzelverdünnungen aus dieser Stammverdünnung: (a) n = 1,
(b) n = 2, (c) n = 4, (d) n = 8.

$$Ext. \cdot 546 \cdot F = ug \text{ N-ANS} \cdot 4 S_n = E/ml$$

(a)	0.52	15.5	200	3100
(b)	0.27	8.05	400	3220
(c)	0.143	4.26	800	3408
(d)	0.07	2.08	1600	3340

Tabelle 10: Mit Hilfe der oben beschriebenen Enzymverdünnungen ermittelte E/ml, deren Extinktionen im Bereich von 0.1 und 0.5 liegen. Der höchste Wert E/ml innerhalb dieses Extinktionsbereiches wird als Aktivität pro ml Ausgangsenzymlösung angenommen, im Beispiel: (c) 3400 E/ml.

B. I. Methoden

2.a) Bestimmung der Gesamtneuraminsäure nach Bial.

Bialreagens: 20 mg Orcin, 8.2 ml conc. HCl, 0.2 ml 1 % FeCl_3 , H_2O ad 10 ml.

Ausführung: Substrat enthaltend ca. 60 ug N-ANS in 1 ml H_2O lösen, mit 1 ml Bialreagens versetzen, 15 Min. kochen lassen (Wasserbad), in Eiswasser abkühlen, in 5 ml Amylalkohol gut ausschütteln, 5 Min. im Kühlschrank aufbewahren (4°C) und in 2 cm - Küvetten bei 546 mu gegen Amylalkohol ablesen.

ug N-ANS = $\text{Ext.}_{546} \cdot 152$; Angabe des N-ANS - Gehaltes des Substrates in Gew.-%.

2.b) Bestimmung der säurehydrolytisch spaltbaren N-ANS (nach Warren (190)).

Substrat enthaltend 30 - 40 ug N-ANS 1 h bei 80°C in 0.5 ml 0.1 n H_2SO_4 spalten (verschlossene Reagensgläser), davon 0.25 ml zur N-ANS - Bestimmung nach Aminoff (9) entnehmen.

Säurehydrolytisch vom Substrat abspaltbare N-ANS (Gew.-%) wird als maximal enzymatisch abspaltbar angenommen. Das tatsächliche enzymatische Spaltungsergebnis wird darauf bezogen (41) (s.a. Kap. B.IV.3.a).

3) Ermittlung des Proteinsgehaltes

a) Relativer Proteingehalt der Einzelfractionen bei Säulenchromatographie.

Photometer mit Durchflußzelle "uvicord" (LKB, Schweden), UV-Absorption bei 280 mu, Angabe in % Absorption; Spektrophotometer PMQ (Zeiss), UV-Absorption bei 280 mu, bei geringen Proteinkonzentrationen bei 210 mu; Angabe in Extinktionen einzelner Fraktionen.

B. I. Methoden

- 3.b) Vergleich der Absorptionen bei 280 mμ und 260 mμ nach einem Nomogramm von E.Adams (8)

Ermittlung der Konzentration von Nucleinsäuren neben Protein. Prinzip nach Warburg und Christian 1943 (189); s.a. Kap. B. III. 1.c.

- 3.c) Proteinbestimmung nach Folin, in der Modifikation von Lowry et al. (129).

Prinzip: Endfarbe entsteht durch Biuretreaktion des Proteins im Alkalischen mit Kupferionen und durch Reduktion des Phosphomolybdat - Phosphowolframat - Reagenzes durch das im Protein vorhandene Tyrosin und Tryptophan

Reagentien: Alkalische Kupferlösung (Herstellung modifiziert): mische 25 ml 2 % Na_2CO_3 in 0.1 n NaOH mit 0.25 ml 1 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ - Lösung und 0.25 ml 2 % Na-Tartrat-Lösung (24 h haltbar).

Folinreagens:

im 1.5 l - Kolben mit Rückflußkühler vorsichtig 100 g $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 25 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ in 700 ml Aq. dest mit 50 ml Phosphorsäure und 100 ml conc. HCl 10 Stunden lang kochen, abkühlen, auf 1 l auffüllen und filtrieren.

Das Reagens sollte nicht grünlich verfärbt sein. Säurekonzentration des Reagenzes durch Titration mit 1 n NaOH ("Titrisol", Merck AG, Darmstadt) bis

B. I. Methoden

zu einem Phenolphthalein - Endpunkt einstellen (ausgeführt am pH - Meter bis pH 7.0).

Ausführung der Bestimmung: 0.2 ml einer Lösung mit 5 - 100 μ g Protein in einem kleinen Reagensglas mit 1 ml Alkalischer Kupferlösung gut vermischen, 10 Min. bei Raumtemperatur stehen lassen, danach 0.1 ml des "auf 1 n in Säure" eingestellten (verdünnten) Folinreagenzes hinzugeben, sofort vermischen und zuletzt am Photometer mit dem Filter I63.4 die Extinktionen gegen einen ebenso behandelten Leerwert ohne Protein ablesen. (Photometer "Elko", Zeiss).

Als Proteinstandard kristallines, electrophoretisch reines Rinderserumalbumin (a grade, Calbiochem); Ermittlung der Proteinkonzentration durch Vergleich der Extinktionen mit einer Eichkurve aus Rinderserumalbumin.

4) Durchführung der Gelfiltration

a) Vorbereitung der Gelpackungen zur Säulenchromatographie

Gequollene Gele G-75 bzw. G-200 (Sephadex, Pharmacia, Uppsala, Schweden) in Säulen mit Puffer (hydrostatischer Druck 30 cm) waschen bis zur Erreichung eines konstanten Gelvolumens. Geloberfläche 3 - 4 mm überschichten mit in gleichem Puffer gequollenem G-25. Proteinlösung (3 mg pro ml) unter den Puffer auf die G-25 - Oberfläche mit ausgezogener Pipette auftragen.

B. I. Methoden

b) Entsalzung und Konzentrierung von Proteinlösungen

Folgende Methode stellt eine Kombination von Entsalzung und Konzentrierung von Proteinlösungen mit Sephadex G-25 dar:

Eine Säule zu $2/3$ mit gequollenem G-25 füllen, mit Puffer waschen, ein Filterpapier, das die Glaswand nicht berührt, auf die Geloberfläche bringen, überstehenden Puffer ablassen, bis das Filterpapier gerade trocken ist.

Protein - Salzlösung mit einer zur Säulenfüllung ($1/3$) ausreichenden Menge trockenen G-25 anrühren, so daß ein fast verklumpender, dickflüssiger Brei entsteht; diesen auf die vorbereitete Gelpackung bringen, langsam mit dem gewünschten Puffer oder mit Wasser nachwaschen, Eluat in Fraktionen auffangen und am Spektrophotometer auf Proteingehalt untersuchen.

Konzentrierung: Proteinlösung in trockenes G-25 einrühren;

entstandene Masse in leerer Glassäule so aufschichten, daß keine Luftblasen entstehen; anschließend mit dem gewünschten Puffer langsam eluieren.

4.c) Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe der Gelfiltration.

Sephadex, Geltyp G-200, fraktioniert Proteingemische vom Molekulargewicht 5 000 bis 800 000.

Sephadex, Geltyp G-75, fraktioniert Proteingemische im Bereich der Molekulargewichte 3 000 bis 70 000.

Als Vergleichssubstanzen für unbekannte Proteine dienen:

1. Rinderserumalbumin (a grade, Calbiochem);
monomere Form (ca. 93 % Molekulargewicht (MG)
67 000, im Säuleneluat durch Messung der

B. I. Methoden

Absorption bei 280 mu oder bei geringer Konzentration bei 210 mu ermittelt; dimere Form (7 %), MG 134 000, nur in relativ hoher Konzentration bei 280 mu im Eluat erkennbar, daher Messung bei 210 mu.

2. Cytochrom c aus Pferdeherzen, kristallin, MG 12 400 inklusive Hämgruppe (Boehringer, Mannheim), im Eluat bei 210 mu ermittelt.

In Anlehnung an die Techniken von Andrews (12) sowie Wieland et al. (196) wird das zu untersuchende Proteingemisch unter den Elutionspuffer auf die G-25 - Geloberfläche gebracht (s.o.). Sammlung des Eluates beginnt, wenn die Hälfte der Proteinlösung in das Gelbett eingesunken ist; Fraktionierung in 2 ml - Proben; Auffanggläschen zur genauen Ermittlung der Elutionsvolumina einzeln vor dem Versuch und sofort nach Einfließen der Fraktion auswiegen.

Ermittlung des Elutionsvolumens V_e eines bestimmten Proteins nach Andrews (12) durch Extrapolation der beiden ansteigenden Schenkel im Proteinmaximum des Elutionsdiagramms; zwei Gerade, die sich über der Spitzenfraktion des Proteins treffen ($1/2$ Spitzenfraktion (ml) = V_e).

5) Anzucht des *Clostridium perfringens*

Cl. perfringens ATCC 10543 (American Type Culture Collection). Abstrich auf einer Blut - Agar Platte,

⁺Schätzung nach dem Verhalten des Albumin bei Ultrazentrifugation, dankenswerterweise durchgeführt im Institut für Allgemeine Botanik der Ruhr-Universität Bochum von Herrn W. Minuth.

B. I. Methoden

zusammen mit *B. protigiosum* als Absorbent des Sauerstoffes des Nährbodens.

Anzucht des *Cl. perfringens* auf Standard I - Nährbouillon (Merck AG, Darmstadt) in 150 - 300 ml Erlenmeyer, deren Böden mit kleinen Stückchen frischer, gekochter Schweineleber bedeckt sind.

Vor Sterilisieren der Nährböden im Autoklaven 15 Min, 1,5 Atü, 120°C, Überschichtung mit 3 mm Paraffin, um anaerobe Verhältnisse zu schaffen. Erstabstrich von der Platte auf 10 ml Leberbouillon, von da in acht bis zehn Passagen je 10 - 30 ml auf vorbereitete Leberbouillon überimpfen. Anwachsen des Stammes innerhalb von sieben Stunden unter Trübung der Kultur und Gasbildung. Zusätzliche Überschichtung der Kulturen mit Stickstoff und Verschluss der Erlenmeyer mit Gärröhrchen, so daß das Ende der Gasbildung bei jedem Ansatz beobachtet werden kann.

6) Gewinnung des Kulturfiltrates

Gewinnung der Neuraminidase aus größeren Kulturansätzen in Anlehnung an das Verfahren von Popenoe und Drew (149): Todd - Hewitt - Nährbouillon (Difco) acht mal fünf Liter.⁺)

⁺) Zur Einarbeitung in die analytischen und präparativen Verfahren dieser Arbeit stellte Dr. med. H. Stickl (München) in dankenswerter Weise insgesamt sieben Liter Sterilfiltrat von Kulturen des gleichen *Cl. perfringens*-Stammes zur Verfügung und gab wertvolle Ratschläge bei der Anzucht des eigenen Stammes.

B. I. Methoden

Die Einzelansätze werden nach Sterilisieren mit 100 bis 200 ml infizierter Bouillon beimpft; Bebrütungszeit 24 h bei 37°C, danach Zentrifugation der Bouillon bei 2 200 g, vom grau-weißen Bodensatz vorsichtig dekantieren, auf 4°C abkühlen und 24 h gegen Fließwasser dialysieren.

Die langwierige Sterilfiltration der Rohenzymlösung durch Membranfilter (Membranfiltergesellschaft, Göttingen) wurde bei sofort anschließender weiterer Aufarbeitung unterlassen.

In einem 5 - Liter - Ansatz nach Zentrifugation:

43 E / ml bei ca. 1 mg Protein / ml.

B. II. Rohenzymkonzentrat

1) Präzipitation mit Ammonsulfat

Einrühren festen Ammonsulfats (AS) bei 0°C bis zu 90 % Sättigung. Nach 24 h wird das Präzipitat von der Oberfläche abgeschöpft. Die klebrige, gelb-braune Masse wird in möglichst wenig H₂O aufgelöst, 48 h gegen 0.001 m KCN bis zur Salzfreiheit dialysiert. Zur Erreichung des gewünschten AS - Sättigungsgrades werden die aus dem Nomogramm nach Dixon (56) für Sättigungen bei 21°C abgelesenen Werte auf 0°C umgerechnet (minus 5 % der bei 21°C nötigen AS - Menge):

AS - Sättigung 90 % bei 21°C: 662 g/l H₂O
bei 0°C: 629 g/l H₂O.

Neuraminidaseaktivität des Rohenzymkonzentrates: durchschnittlich 300 E/ml; bei ca. 7 mg Protein /ml, spezifische Aktivität: zwischen 40 und 50 E / mg Protein.

Nach zweijähriger Lagerung des Rohenzymkonzentrates, Lyophilisation und Dialyse gegen 0.001 m Kaliumphosphatpuffer pH 6.0 ergeben sich folgende spezifische Aktivitäten:

Lagerung bei 4°C 700 E/mg Protein,
Lagerung bei -20°C 750 E/mg Protein.

2) Versuch einer Fraktionierung des Konzentrates mit gesättigter Ammonsulfatlösung

Aqua dest. wird bei 0°C mit festem AS gesättigt; die Lösung wird mehrere Tage über AS - Kristallen stehen gelassen.

Zu 185 ml Rohenzymkonzentrat (frisch hergestellt) wird kalt gesättigte AS - Lösung bei 0°C in abgemessenen kleinen Proben unter Rühren hinzugegeben. Nach 30 Min. wird die Lösung zentrifugiert, das Präzipitat in einer kleinen Menge Wasser gelöst und erschöpfend gegen 0.001 m KCN dialysiert.

B. II. Rohenzymkonzentrat

Prinzip der AS - Konzentrationsermittlung der Rohenzym-lösung:

100 ml gesättigte AS - Lösung enthalten 72 g (0°). Zur Ermittlung der AS - Sättigung in % bei 0°C werden

- die Gesamtmenge der Lösung in ml und
- ihr Gehalt an AS in g entsprechend der vorher hinzugegebenen Menge an AS - Lösung bestimmt,
- die AS - Konzentration der Enzymlösung in g/l errechnet,
- von nötiger AS - Salzmenge bei 0°C auf die bei 21°C (plus 5 %) umgerechnet und schließlich
- der betreffende Sättigungsgrad in % aus einer für AS-Konzentrationen bei 21°C vorliegenden Tabelle abgelesen ("Methode in Enzymology", Vol. I, p.76, Acad.Press, N.Y., 1963).

Präzipitat -Nr.	%-Sättigung	ml Präzipi- tat-Lösung	E. 10^3 total	% E total
	0		48.0	100
	0 - 25	-	-	-
	25 - 47	-	-	-
(1)	47 - 58	3	0.3	0.6
	58 - 63	-	-	-
(2)	63 - 70	8	11.2	25
(3)	70 - 80	8.5	34.0	70.8
(4)	80 - 86	11.5	11.5	31.3
(5)	86 - 92	21.5	8.6	17.9
(6)	92 - 95	21	0.4	0.8
Summe (1) - (6):			66.0	146.4 .

Tabelle 11: E $\cdot 10^3$ total = Gesamteinheiten
% E total = Einheiten in % von 0 % AS-Sättigung
an gerechnet (= 100 %).

Der Hauptteil des enzymatisch aktiven Proteins präzipitiert bei 70 - 80 % AS-Sättigung. Eine Anreicherung der enzymatischen Aktivität um ungefähr 50 % insgesamt gegenüber dem Rohenzymkonzentrat (s. Tab. 11, Summe) kann damit erklärt werden, daß im Zuge der Isolierung des Enzyms Enzymhemmstoffe beseitigt werden.

B. III. Chromatographische Reinigung des Rohenzym

1.a) Säulenchromatographie an Hydroxylapatit

Verfahren nach Ada 1963 (1) zur Reinigung der Neuraminidase aus der Chorioallantoismembran von Kühnerembryonen.

Ausführung: Zwei Jahre gelagertes Rohenzympräparat aus *Cl.perfringens* zunächst an Sephadex G-75 vorgereinigt; die daraus gewonnene Fraktion I (s. Kap. II.1.c) wurde gegen 0.09 m Kaliumphosphatpuffer pH 6.8 -- 0.02 n NaCl dialysiert und auf eine mit dem gleichen Puffer gewaschene 1.5 X 21 cm Hydroxylapatitsäule gegeben. Ein kleiner Teil der enzymatischen Aktivität eluierte zwar schon bei der Adsorption (Ada (1)) in 0.09 m Phosphatpuffer pH 6.8 -- 0.02 m NaCl sowie während des ersten Salzgradienten (0.25 n NaCl -- 0.02 m Phosphatpuffer pH 7.8 bis 0.35 n NaCl -- 0.045 m Phosphatpuffer, pH 7.8). Der Hauptanteil des Enzyms verließ die Säule an der von Ada (1) beschriebenen Stelle hinter dem ersten Salzgradienten offenbar in einer sehr reinen Form, da trotz relativ hoher Enzymaktivität der Einzelfraktionen kein Protein bei 280 m μ nachgewiesen werden konnte.

Die Enzymfraktion wurde sofort eingefroren. Danach konnte nach langsamem Auftauen am nächsten Tag die Enzymaktivität weder nach Dialyse zur Entfernung der Salze, im Dialysat, noch nach Einengen der gesammelten enzymhaltigen Fraktionen wiedergefunden werden (s. Kap. A.VI.).

b) Chromatographie an DEAE - Cellulose

Verfahren nach Hughes und Jeanloz (102) zur Reinigung des Rohenzymkonzentrates der Neuraminidase aus *D.pneumoniae*.

Ausführung: Das Verfahren wird in einem Versuch, die Rohenzymkonzentratlösung der *Cl.perfringens* - Neuraminidase von den schwarz-braunen Begleitstoffen aus der

B. III. Chromatographische Reinigung des Rohenzym

Todd - Hewitt - Nährbouillon zu befreien, wie folgt abgewandelt:

55 ml Rohenzymkonzentrat pH 6.0 werden in die vorbereitete DEAE - Cellulose - Masse eingerührt und diese nach 30 Min. abzentrifugiert; im wasserklaren Überstand pH 6.0 keine Enzymaktivität. Herauswaschen des Enzyms gelingt erst durch Waschen der mit Enzym und den gefärbten Begleitstoffen der Todd - Hewitt - Nährbouillon beladenen DEAE - Cellulose mit 0.06 m bis 0.1 m KCl - Gradienten (114 ml wasserklare Lösung) und weiter mit 0.2 ml KCl (47 ml wasserklare Lösung). Alle Prozeduren bei Raumtemperatur.

In 50 ml eingesetzter RohenzymLösung waren total 100 000 E; die Fraktion des Gradienten 0.06 m bis 0.1 m KCl enthält in 114 ml 48 500 E; in der Fraktion mit 0.2 m KCl (47 ml) sind 27 200 E enthalten. Von 100 000 E Rohenzym werden in wasserklarer Lösung 75 700 E wiedererhalten, als 75.7 %.

Spezifische Aktivitäten:

Rohenzym 1460 E/mg Protein (z.T. an Sephadex G-75 vorge-reinigt); Enzym in 114 ml nach Chromatographie 2500 E/mg Protein; zweifache Reinigung.

Stabilität:

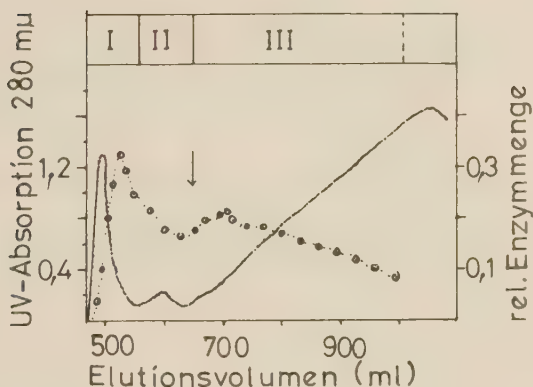
Das so gewonnene Präparat wird dialysiert (gegen H₂O) und auf 50 ml durch Lyophilisation eingeengt. Dabei wird kein Aktivitätsverlust festgestellt. Nach 8 Tagen Aufbewahren bei 4°C sind ca 10 % der enzymatischen Aktivität verloren.

c) Chromatographie an Sephadex G-75
und DEAE - Cellulose

Verfahren nach Cassidy et al. (45) zur Reinigung der Neuraminidase aus Cl. perfringens.

B. III. Chromatographische Reinigung des Rohenzym

Ausführung: Zwei Jahre altes Rohenzymkonzentrat (im Gegensatz zu Cassidy et al. (45): frisches Rohenzym) über Sephadex G-75 Molekularsieb in 0.001 m Kaliumphosphatpuffer pH 6.0 gereinigt. Methode ergibt in drei gleichartigen Versuchen folgendes Elutionsdiagramm (Fig. 3):



Figur 3: Gelfiltration eines zwei Jahre gelagerten Rohenzympräparates auf Sephadex G-75 (4 X 95 cm-Säule); (.....) relativer "Proteingehalt" (s. Tab. 12, ff.) nach der UV-Absorption bei 280 mμ; (o-o-o) relativer Enzymgehalt der Einzel-fractionen (Ext_{546} nach Aminoff (8), s. Kap. B.I.1); I, II und III: "Proteinmaxima" (280 mμ) in drei Fractionen
 ↓ Beginn der Elution gefärbter Begleitstoffe aus der Todd - Herwitt - Nährbouillon.

B. III. Chromatographische Reinigung des Rohenzym

Untersuchung der "Proteinfraktionen" I, II und III auf ihren wahren Proteingehalt:

Fraktion	Protein Folin (mg/ml)	Absorpt. ⁺⁺	
		210:280 mu	Absorpt. 280:260 mu ⁺⁺⁺ =Prot.: Nukleinsäure
I	2 - 3	5 : 1	45 : 1
II	42	14 : 1	59 : 1
III	20 - 25 ⁺	—	24 : 1

Tabelle 12: ⁺ Werte ermittelt zu Beginn und Ende der Absorptionskurve (280 mu, Fig. 3) der Fraktion III;

⁺⁺ Extinktionsverhältnis für reine Proteine nach Tombs und Souter (182) für Ext. 210 : 280 mu = 20 : 1 (für Fraktion III nicht bestimmt);

⁺⁺⁺ nach Warburg und Christian (189) (Kap. B.I.3.b).

Die Messungen der Fraktionen I und II wurden mit den Spitzenfraktionen der Maxima (Fig. 3) durchgeführt.

Hauptfraktion I (s. Fig. 3 und 4):

Die Fraktion enthält Substanzen, deren Molekulargewicht über 100 000 liegt, da diese Fraktion auch bei Gelfiltration auf Sephadex G-200 in der "Front", d.h. oberhalb der Ausschlußgrenze der Gelpartikel erscheint (s. Kap. B. I.4.c). Der geringe Proteingehalt nach Folin (s.Tab. 12) in seinem Verhältnis zur Höhe der Absorption bei 280 mu, ferner die geringe Absorption bei 210 mu im Verhältnis zu derjenigen bei 280 mu sprechen gegen einen nennenswerten Proteingehalt dieser Fraktion. Denn die scheinbar hohe Relation, Protein : Nukleinsäure, scheint durch unspezifische Absorptionen bei 280 und 260 mu bedingt zu sein.

B. III. Chromatographische Reinigung des Rohenzym

Für diese Vermutung spricht ferner (s. Fig. 4), daß die Proteinbestimmung nach Folin für Peptidbindungen und die Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan hochspezifisch ist (s. Kap. B.I.3.c); das Verhältnis der Extinktionskoeffizienten bei $280\text{ m}\mu$ ist nach Tombs et al. (182) für Proteine $20 : 1$, und bei $280\text{ m}\mu$ liegen die Absorptionsmaxima für Tyrosin und Tryptophan (Beaven und Holiday (17)), nicht aber für Proteine schlechthin.

Hauptfraktion II (s. Fig. 3 und 4):

Sie enthält entsprechend dem Extinktionsverhältnis von $14 : 1$ bei $210 : 280\text{ m}\mu$ ungefähr zu $2/3$ Protein.

Hauptfraktion III

Der Proteingehalt im Endteil der Absorptionskurve bei $280\text{ m}\mu$ ist nur ungenau bestimmbar, da die braun-schwarzen Inhaltsstoffe der Todd - Hewitt Bouillon (Fig. 3 und 4) in ansteigender Konzentration darin enthalten sind und die hohe Absorption bei $280\text{ m}\mu$ verursachen. Zur Proteinbestimmung nach Folin wurde zwar das Protein mit 20% Trichloressigsäure (180) ausgefällt, gleichzeitig aber auch ein Teil der gefärbten Stoffe.

Ergebnis der Säulenchromatographie an Sephadex G-75:
Spezifische Aktivität des zwei Jahre gelagerten Rohenzympräparates 700 E/mg Protein ; Hauptfraktion I (Fig.3)
 $1\text{ }250\text{ E/mg Protein}$; zweifache Reinigung.

Stabilität des zweifach gereinigten Enzyms:

100 ml aus Fraktion I (Fig. 3) werden 12 h gegen H_2O dialysiert, gefriergetrocknet und in $12\text{ ml } 0.01\text{ m}$ Kaliumphosphatpuffer pH 6.0 wieder aufgenommen; da

B. III. Chromatographische Reinigung des Rohenzym

bei diesem Einzelversuch die enzymatische Aktivität keine Abnahme zeigt, wird diese Methode der Einengung derart angereicherter enzymhaltiger Lösungen weiterhin benutzt.

Versuch einer weiteren Reinigung an DEAE - Cellulose:

Verfahren nach Cassidy et al. (45):

Im Anschluß an G-75 Chromatographie wird das Enzym an den Ionenaustauscher in 0.01 m Kaliumphosphatpuffer adsorbiert und mit einem KCl-Gradienten von 0.025 bis 0.15 m, pH 6.0 eluiert.

Die Ergebnisse dreier Versuche zeigen, daß eine weitere Reinigung der Neuraminidase aus Fraktion I (Fig. 3) der Sephadex G-75 Gelfiltration unter Erhaltung ihrer Aktivität auf diesem Wege nicht möglich ist. Alle Versuche, die enzymatisch aktiven Fraktionen einzuengen, führen zur Inaktivierung: Dialyse zur Entfernung der Salze, partielle oder komplette Lyophilisation sowie bloßes Einfrieren und Auftauen.

2) Säulenchromatographie an Sephadex G-200

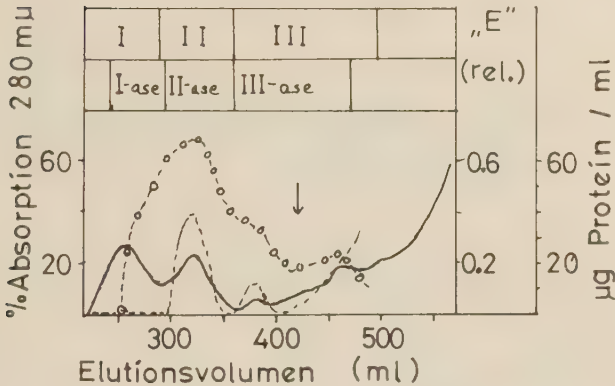
Ausgangsmaterial: zwei Jahre gelagertes Rohenzymkonzentrat. Drei in gleicher Weise durchgeführte Versuche ergeben identische Ergebnisse hinsichtlich des Elutionsdiagrammes (s. Fig. 4) und ungefähr die gleichen Reinigungsergebnisse (Tabelle 13).

Beispiel:

3 X 102 cm Säule mit Sephadex G-200 in der oben (Kap. B.I.4a) beschriebenen Weise vorbereitet; mit 5.8 ml einer durch partielle Lyophilisation hochkonzentrierten Rohenzymlösung beschickt.

B. III. Chromatographische Reinigung des Rohenzyms

Elutionspuffer: 0.01 m Kaliumphosphatpuffer mit 1 % n-Butanol (zur Desinfektion der Säulenpackung), gasfrei durch Rühren unter Wasserstrahlvakuum.



Figur 4: Gelfiltration eines zwei Jahre gelagerten Rohenzym auf Sephadex G-200. Das enzymatisch aktive Eluat wird in die Fraktionen I-ase, II-ase und III-ase zusammengefaßt. Fraktionen I, II und III sind Absorptions- bzw. Proteinmaxima entsprechend Fig. 3.
 (—) relativer Proteingehalt, % Absorption 280 mμ;
 (o-o) relativer Neuraminidasegehalt (Ext₅₄₆ nach Aminoff (s. Kap. B.I.1.b);
 (---) Proteingehalt der Einzelaktionen nach Folin (Kap. B.I.3.c);
 Elut. onsbeginn der gefärbten Stoffe der Kultur.

B. III. Chromatographische Reinigung des Rohenzym

Reinigungsergebnis (Tab. 13):

Fraktion	Menge (ml)	E · 10 ³ total	Spez.Akt. E/mg Prot.	% (Gesamt-) Ausbeute
Rohenzym ⁺	5.8	275	734	
I-ase	30	27	16 380	9.8
II-ase	55	64.3	7 800	23.4
III-ase	120	96.2	10 000	35.0
Summe:				68.2

Tabelle 13: Gelfiltration eines Rohenzymkonzentrates an Sephadex G-200, Zusammenstellung der Versuchsergebnisse.
+ Ausgangsmaterial;
E = Enzymeinheiten (s. Kap. B.I.1.a).

10 - und 20 - fache Zunahme der spezifischen Aktivität der Neuraminidase. Ausbeuten insgesamt (drei Versuche) zwischen 65 und 75 %.

Stabilität der Neuraminidase in Fraktion III-ase (Fig. 4 und Tab. 13): Tabelle 14.

Zeit	Art der Behandlung	ml	E · 10 ³ total	Spez. Akt.	Prot. mg/ml
1. Tag nach	Gelfiltration	120	96.2	10 000	0.08
2. Tag:	Lyophilisation	72	108.0	11 250	0.133
3. Tag:	Dialyse ⁺	83	95.7	nicht bestimmt	
4. Tag:	Lyophilisation	25	127.5	nicht bestimmt	
11. Tag:	Lyophilisation	4	40.0	12 500	0.8

Tabelle 14: Neuraminidasestabilität der Fraktion III-ase nach Gelfiltration an Sephadex G-200.
+ Leichte Flockung der Proteinlösung; Bestimmungen nach Zentrifugation; im Zentrifugat keine enzymatische Aktivität feststellbar.
Spez.Akt.: Spezifische Aktivität E/mg Protein.

B. III. Chromatographische Reinigung des Rohenzym

Zusammenfassung der Kapitel B. III.1 und B. III.2.

Von den hier ausprobierten Reinigungsmethoden erweisen sich folgende als brauchbar zur Reinigung eines zwei Jahre gelagerten Rohenzymkonzentrates aus *Cl. perfringens*:

1. Gelfiltration an Sephadex G-75 wegen der Stabilität derart gereinigten Neuraminidase. Nachteil: nur zweifache Zunahme der spezifischen Aktivität.
2. DEAE - Cellulose - Verfahren nach Hughes und Jeanloz: Entfernung der gefärbten Stoffe der Nährbouillon bei zweifacher Zunahme der spezifischen Aktivität; hohe Stabilität der gereinigten Neuraminidase.
3. Chromatographie an Sephadex G-200: beste Methode zur Vorreinigung wegen des guten Reinigungsergebnisses (10 - 20-fach) und guter Stabilität.

Die hochgradige Instabilität der mit den anderen beschriebenen Verfahren (Hydroxylapatit- und DEAE-Cellulose-Chromatographie) gereinigten Neuraminidase macht eine Konzentrierung oder Konservierung der enzymatischen Aktivität mit den bisher gebräuchlichen Methoden unmöglich. Die Verfahren sind deshalb so lange für diese Fragestellung unbrauchbar, bis ein Verfahren zur Konzentrierung der stark verdünnten enzymhaltigen Fraktionen ohne Aktivitätsverlust gefunden ist.

B. IV. Charakterisierung des Enzyms

1) Neuraminidase - Protein - Adsorbate.

a) Chromatographie eines Neuraminidase - Rinderserumalbuminadsorbates an Sephadex G-200.

Ausgehend von der über Sephadex G-200 vorgereinigten Neuraminidase der Enzymfraktionen I-ase und II-ase (Fig. 4) wird versucht, den Molekulargewichtsbereich dieser Fraktionen abzustecken. Als Vergleichssubstanz dient Rinderserumalbumin (RSA) (s. Kap. B.I.4.c), das auch eine Wirkung als Schutzsubstanz der Neuraminidase besitzt (s. Kap. A.VI.).

Durchführung in Anlehnung an Andrews (12) und Flodin (73):

Eine 2 X 80 cm Sephadex G-200 - Säule, in der oben beschriebenen Weise vorbereitet (Kap. B.I.4.a), wird mit 0.001 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.0, enthaltend 1 % n-Butanol und 0.001 M Na-EDTA-NaOH pro Liter, gewaschen; Puffer vorher im Wasserstrahlvakuum entgast, damit keine Gasblasen in der Säule entstehen und den gleichmäßigen Fluß stören.

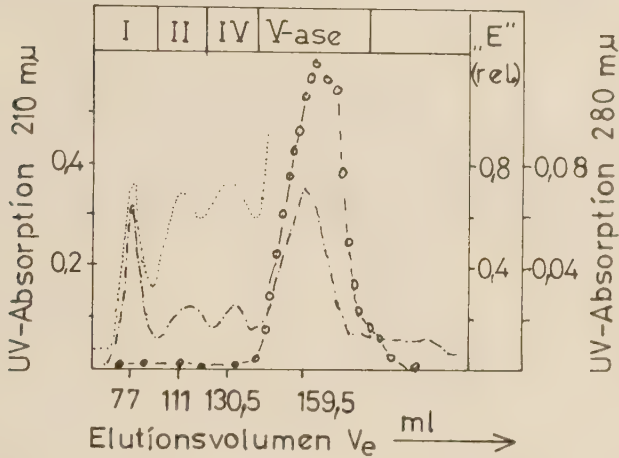
Drei Vorversuche mit 3.5, 5.5 und 6 mg RSA (a grade, Calbiochem) im 2 ml Puffer ergeben folgende Elutionvolumina (V_e):

dimeres RSA : 129.5 ± 5 ml;
monomeres RSA : 161.0 ± 5 ml.

Chromatographie eines Gemisches aus 3.5 mg RSA und 1.6 mg enzymatisch aktiven Proteins in 2 ml Puffer;

B. IV. Charakterisierung des Enzyms

Ergebnisse in Fig. 5:



Figur 5: Gelfiltration der Enzymfraktionen I-ase und II-ase (Fig. 4) im Gemisch mit Rinderserumalbumin auf Sephadex G-200.
(.....) UV - Absorption bei 210 m μ
(-.-.-) UV - Absorption bei 280 m μ
(o-o-o) relative Enzymmengen (s. Kap. B.I.1).
I und II entsprechen den Absorptions- bzw. Proteinformen der Fig. 3 und 4.
Fraktion IV enthält dimeres Rinderserumalbumin;
Fraktion V-ase enthält das monomere Albumin und die Neuraminidase (aus Frakt. I-ase und II-ase, Fig. 4).

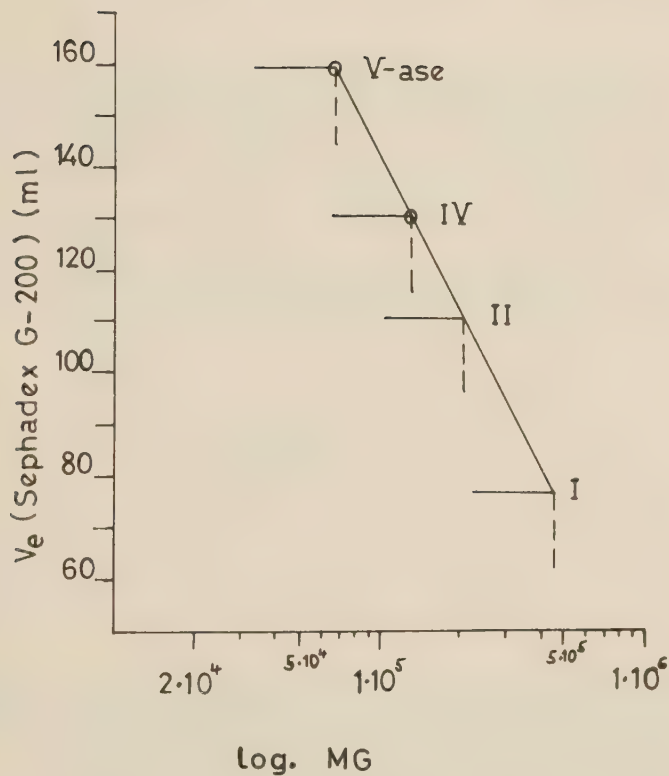
B. IV. Charakterisierung des Enzyms

Das Elutionsvolumen V_e der Fraktion V-ase (159,5 ml) entspricht dem des monomeren RSA ohne Enzym (161 ± 5 ml).

Molekulargewichtsbereiche der Fraktionen I und II (auf die Säule aufgetragen als enzymhaltige Fraktion I-ase und II-ase):

Eichgerade: V_e des dimeren (IV) (MG 134 000) und monomeren (V) Albumin (MG 67 000) gegen den Logarithmus ihrer Molekulargewichte aufgetragen. Die Diagrammpunkte für I und II liegen auf der Verlängerung der Geraden V - IV; Ergebnis s. Fig. 6:

B. IV. Charakterisierung des Enzyms



Figur 6: MG der Fraktion I : 450 000;
MG der Fraktion II : 200 000.

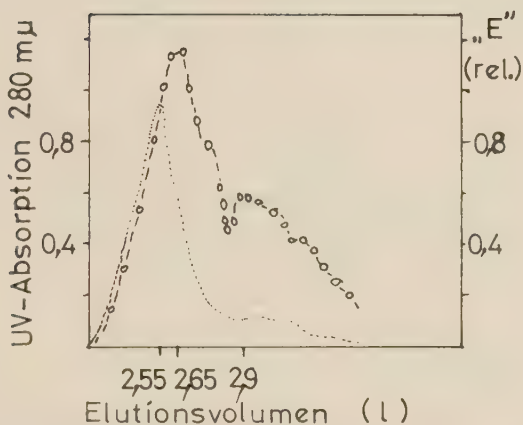
B. IV. Charakterisierung des Enzyms

Aktivität der Neuraminidase: Überraschenderweise weder in Fraktion I (als I-ase) noch in Fraktion II (als II-ase), sondern ausschließlich in der Fraktion des monomeren RSA als Fraktion "V-ase". Offenbar ist ein Adsorbat oder eine Art Komplex zwischen Neuraminidase und RSA entstanden.

Von 3 200 E total, die mit I-ase und II-ase als vorge-reinigte Neuraminidase chromatographiert wurden, sind 2 400 E in Fraktion V-ase enthalten; Enzymausbeute 75 %. Dieses Ergebnis ließ sich in zwei ebenso durchgeführten Versuchen reproduzieren.

Ein Versuch mit einer größeren Säule Sephadex G-200 führt zu einem etwas anderen Trennergebnis (Fig. 7):

B. IV. Charakterisierung des Enzyms



Figur 7: Ausschnitt aus dem Elutionsdiagramm einer 7 X 110 cm Sephadex G-200 - Säule mit einem Gemisch (19 ml) aus vorgereinigtem Rohenzym (Fraktionen I-ase und II-ase, Fig. 4), enthaltend 30 mg Protein und 30 mg Rinderserumalbumin: zwei Neuraminidase - Maxima an der Stelle der Fraktion V-ase der Figur 5.
 (....) UV-Absorption 280 mμ; monomeres Albumin;
 (o-o-) relative Enzymmengen (E rel.), s. Kap. B.I.1.

B. IV. Charakterisierung des Enzyms

Aktivität der Neuraminidase - Spitzenfraktionen
(Fig. 7):

erstes Maximum (2650 ml) mit 11 640 E/mg Protein;
zweites Maximum (2900 ml) ungefähr 50 000 E/mg Protein.

Der letzte Wert ist ungenau, weil die Proteinkonzentration in dieser Fraktion zur Bestimmung nach Folin an der unteren Grenze (5 $\mu\text{g/ml}$) liegt. Konzentrierung dieser Fraktion wird wegen der Gefahr einer Inaktivierung des Enzyms unterlassen. Dieses Material wird für die Enzymcharakterisierungen Kap. B.IV. verwandt.

Ein ähnlicher Versuch von Ada 1963 (1), Gelfiltration der Neuraminidase aus Hühner - Chorioallantoismembranen an Sephadex G-75), wird vom Autor wie folgt beschrieben: "Die meiste Enzymaktivität wurde zusammen mit der Masse der Proteine wiedergewonnen, während ein kleiner Teil der Aktivität offenbar langsamer lief".

1.b) Versuch zur Dissoziation des Neuraminidase - Albumin Komplexes.

Prinzip: Trennung von Protein - Aggregationen durch Erhöhung der Ionenkonzentration. Auf diesem Prinzip beruht auch das von Ada 1963 (1) angegebene Puffersystem (s. Kap. A. VI.) zur Verhinderung von Neuraminidase - Fremdproteinkomplexen.

Ausführung: 2 X 80 cm Sephadex G-200 - Säule wird mit 0.001 m Kaliumphosphatpuffer pH 6.0, 1 % n-Butanol, 0.001 m Na-EDTA - KOH mit 1 M NaCl pro Liter gewaschen. Fraktion V-ase, einer der im vorigen Abschnitt beschriebenen Säuleneluate (s. Fig. 5) (Neuraminidase - Albumin - Adsorbat), wird auf 2 ml durch Lyophilisation ohne vorherige Entfernung der Salze durch Dialyse eingengt. Durch Zugabe von 0.2 g Saccharose wird das spezifische Gewicht der 2 ml erhöht, so daß sich die

B. IV. Charakterisierung des Enzyms

Lösung leicht unter den stark salzhaltigen Puffer auf die Geloberfläche der Säule auftragen läßt.

Einzelfractionen 2 ml; durch den hohen Kochsalzgehalt wird die Messung der enzymatischen Aktivität gestört. Deswegen werden die albuminhaltigen Fractionen der Säule gesammelt und mit Sephadex G-25 (s. Kap. B.I.4.b) entsalzt. Ebenso werden Vor- und Nachlauf der albuminhaltigen Fraction entsalzt.

Ergebnis: Die enzymatische Aktivität der zur Chromatographie aufgetragenen Lösung von insgesamt rund 1300 E wird nach Entsalzung in der albuminhaltigen Fraction der Säule fast quantitativ wiedergefunden: 1100 E.

Mit 1 n NaCl - Puffer kann also keine Trennung der Neuraminidase vom monomeren Albumin erreicht werden. Bei diesem Versuch stellte sich heraus, daß die Neuraminidase im Komplex mit Albumin gegen die Einwirkung der hohen Salzkonzentration außergewöhnlich stabil ist, zumal, da der Versuch wegen der Gefahr der Verstopfung der Säule durch auskristallisierendes Kochsalz bei Raumtemperatur durchgeführt wurde. Diese Stabilität steht im Gegensatz zu der des an Hydroxylapatit chromatographierten Neuraminidasepräparates, das schon in einer sehr viel geringeren konzentrierten Salzlösung beim Einfrieren und Auftauen seine gesamte Aktivität verlor (s. Kap. B.III.1.a).

Das Neuraminidase - Albuminpräparat ist ferner mit Sicherheit 14 Tage lang bei 4°C in 1 n NaCl-Lösung ohne Aktivitätsverlust stabil.

B. IV. Charakterisierung des Enzyms

1.c) Bildung eines Neuraminidase - Cytochrom c - Adsorbates.

Prinzip: Da sich eine Trennung der Neuraminidase vom monomeren RSA (MG 67 000) unter den beschriebenen Bedingungen nicht erreichen läßt, wird versucht, das Phänomen der Adsorption der Neuraminidase an ein Träger-eiweiß zur Loslösung vom Albumin auszunützen. Chromatographie eines Gemisches aus Neuraminidase - Albumin Adsorbat mit Cytochrom c (MG 12 400) an Sephadex Molekularsieb Typ G-75 (s. Kap. B.I.4.c) soll 1. die Gültigkeit des Adsorptionsphänomens auch für andere Proteine als Albumin erhärten, 2. eine Trennung des Enzyms vom Albumin und 3. einen weiteren Anhaltspunkt für die Beurteilung des wirklichen Molekulargewichtes der Neuraminidase erbringen.

Nach dem Adsorptionsergebnis an das Albumin ist Neuraminidase aus Cl.perfringens sicherlich nicht größer als MG 67 000 (monomeres Albumin; s. Fig. 5 und 6), wahrscheinlich sogar erheblich kleiner, denn der Enzym - Albumin Komplex zeigt auf G-200 das gleiche Elutionsvolumen wie monomeres Albumin allein (s. Kap. B.IV.1.a). Dies deutet darauf hin, daß das "Gesamt-molekül" aus Neuraminidase und monomerem Albumin nicht nennenswert größer sein kann als das monomere Albumin allein. Ein Adsorbat aus Neuraminidase und dem kleinen Protein-molekül des Cytochrom c müßte jedoch, nimmt man ein Molekulargewicht von 10 000 für die Neuraminidase an, deutlich schneller auf dem Sephadex - Molekularsiebtyp wandern als Cytochrom c allein, da ein solches Adsorbat ein MG von 22 400 hätte.

Ausführung: Als Geltyp wird Sephadex G-75 gewählt, weil sein Fraktionierungsbereich für Proteine von MG 3 000 bis 70 000 reicht (s. Kap. B.I.4.c).

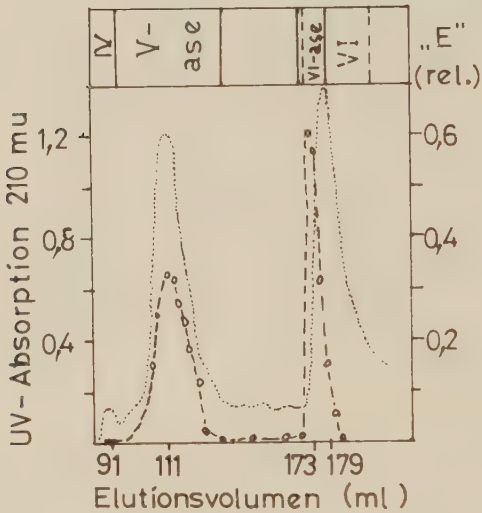
Säuleneichnung: Eine 2 X 80 cm Säulenpackung G-75 wird mit 0.001 M Kaliumphosphatpuffer, enthaltend 1 % n-Butanol, 0.001 M NaEDTA - KOH pro Liter, pH 6.0, gewaschen.

B. IV. Charakterisierung des Enzyms

Zur Bestimmung der Elutionsvolumina V_e für RSA und Cytochrom c werden 2 mg des Albumin und 3 mg Cytochrom in 2 ml Puffer gelöst und chromatographiert. V_e in zwei Versuchen für dimeres Albumin 92 ± 4 ml, für monomeres Albumin 113 ± 1 ml und für Cytochrom c: 178 ± 1 ml. Der Farbstoff des Cytochrom c erscheint in gleichmäßig abnehmender Konzentration im Anschluß an den bei 210 m μ gut meßbaren, scharf begrenzten und beinahe ungefärbten Proteinpeak im Eluat der Säule (s. Fig. 8). Die Bindung der H α -Gruppe an das Protein dieses Cytochrom c - Präparates (Boehringer, Mannheim) ist also uneinheitlich und unvollständig.

Versuch (s. Fig. 8): 3 mg Cytochrom c werden zu 2 ml einer durch Lyophilisation eingegangenen Fraktion V-ase (Neuraminidase - Albumin Adsorbat, s. Fig. 5, Kap. B.IV.1.a) hinzugegeben. Dieses Gemisch wird an der vorbereiteten G-75 - Säule chromatographiert. Nach Messung der UV-Absorption der Einzelfractionen und Bestimmung der relativen Neuraminidase-Konzentration im Eluat (0.25 ml aus jeder Fraktion mit 0.25 ml Standardsubstratlösung 30 Min. bei 37°C inkubiert) ergibt sich folgendes Elutionsdiagramm (Fig. 8):

B. IV. Charakterisierung des Enzyms



Figur 8: Gelfiltration eines Gemisches aus Neuraminidase-Albumin (monomer) Adsorbat und Cytochrom c über Sephadex G-75.
 (.....) UV-Absorption der Proteine bei 210 mμ;
 (o.o.o.o.o) relative Neuraminidase - Aktivität der Einzelfractionen. Bestimmung der Elutionsvolumina s. Kap. B.I.4.c.

Ergebnis: Vier Maxima werden ermittelt:

Fraktion IV, V_e ca 91 ml; dimeres Albumin;

B. IV. Charakterisierung des Enzyms

Fraktion V-ase, V_e 111 ml; Neuraminidase mit dem monomeren Albumin (identische Elutionsvolumina);

Fraktion VI-ase, V_e 173 ml; Neuraminidase - Cytochrom c Adsorbat;

Fraktion VI, V_e 179 ml; Cytochrom c allein.

Das Neuraminidase - Cytochrom c Adsorbat (Fraktion VI-ase) verläßt die Chromatographiesäule 6 ml früher als das eigentliche Cytochrom c - Maximum (Fraktion VI). Ein anderer Teil des Enzyms bleibt an das monomere Albumin adsorbiert (Fraktion V-ase).

Neuraminidase - Aktivität: Zur Gelfiltration über Sephadex G-75 (s. Fig. 8) eingesetztes Enzym: 5 320 E insgesamt; Fraktion V: 640 E insgesamt; Fraktion VIa: 640 E insgesamt. Ausbeute 24 %.

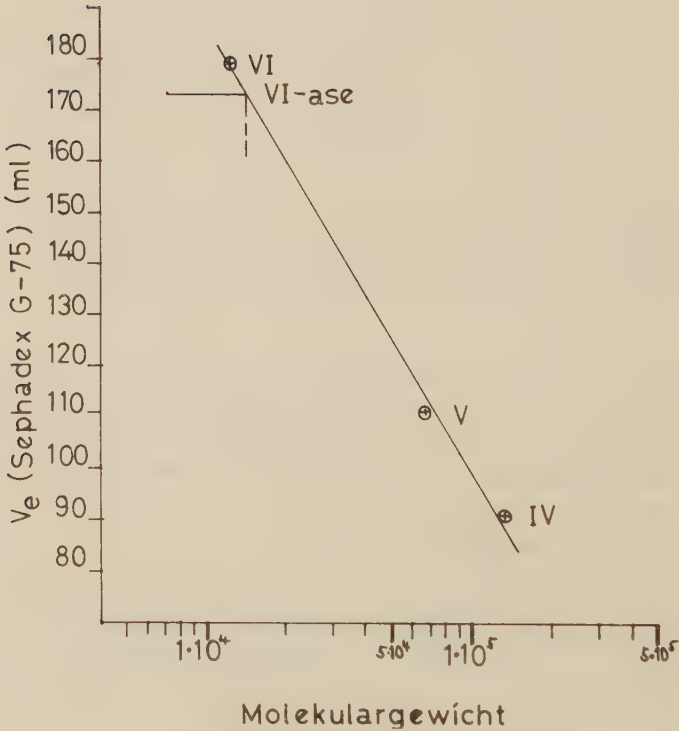
Der hohe Verlust an enzymatischer Aktivität ist mit der inaktivierenden Wirkung des Cytochrom c - Eisens und eventuell mit der Oxydase-Eigenschaft des Cytochrom erklärbar, während eine Inaktivierung des Enzyms im Verband mit Albumin nach den vorne geschilderten Versuchen sehr unwahrscheinlich ist.

Nach 4 Wochen Lagerung bei 4°C ist in der Cytochromfraktion keine Enzymaktivität mehr nachweisbar.⁺

⁺Mitteilung von Frau Dr. med. Biedl, Institut für Physiologische Chemie der Ruhr-Universität Bochum.

V. IV. Charakterisierung des Enzyms

2) Untersuchung zum Molekulargewicht der Neuraminidase.



Figur 9: Molekulargewicht (log.) gegen Elutionsvolumina der Fraktionen IV, V und VI (Fig. 8) aufgetragen, um das Molekulargewicht der Fraktion VI-ase aus seinem Elutionsvolumen nach Gel-filtration auf Sephadex G-75 zu ermitteln.

B. IV. Charakterisierung des Enzyms

In Figur 9 ist das für Cytochrom c gefundene Elutionsvolumen als Bezugswert angenommen und die Eichgerade durch diesen Punkt und einen durch Regressionsrechnung ermittelten Mittelwert der Koordinaten der Punkte IV und V gelegt: MG der Fraktion VI-ase 15 000, der Neuraminidase demnach 2 600.

Läßt man den für Fraktion IV (dimeres Albumin) ermittelten Punkt in Figur 9 außer Acht und legt die Eichgerade nur durch die Punkte der Fraktionen V und VI, so wird für das Neuraminidase-Cytochrom c - Adsorbat ein MG von 14 000 abgelesen und entsprechend für Neuraminidase ein MG von 1 600 errechnet.

Aus der in Figur 9 demonstrierten graphischen Ermittlung der Molekulargewichte ergibt sich aufgrund der Elutionsvolumina für das Neuraminidase-Cytochrom c - Adsorbat (Fraktion VI-ase, Fig. 8) ein MG von 14 000 bis 15 000, was für die Neuraminidase allein bei Subtraktion des MG Cytochrom c (12 400) ein extrem niedriges MG von 1 600 bis 2 600 bedeuten würde.

Die Fehlerbreite der Ergebnisse ist ungefähr aus der Streuung der ermittelten Elutionsvolumina zu ersehen (s. Kap. B.IV.1). Nach Andrews (12) dürfen zur exakten Molekulargewichtsbestimmung mit der Methode der Gelfiltration die Elutionsvolumina der untersuchten Proteine bei mehreren Versuchen um $\pm 2\%$ differieren. Zur Ermittlung einer exakten Eichgeraden sind jedoch mehr als zwei bis drei Vergleichsproteine heranzuziehen, damit die Streuung der Ergebnisse (Elutionsvolumina) besser ausgeglichen werden kann. Ferner sollte die Konzentration der zur Chromatographie eingesetzten Proteine in mehreren Vorversuchen variiert werden, da Unterschiede in der Dichte der Proteinlösungen Änderungen im Fließverhalten des betreffenden Proteins während der Gelfiltration zur Folge haben (Andrews (12)).

Die hier beschriebenen Versuche zielten vor allem darauf, das Phänomen der Proteinadsorption der Neuraminidase zu studieren. Andere, geeignetere Proteine

B. IV. Charakterisierung des Enzyms

der Größenordnung 5 000 bis 50 000 waren zunächst nicht zu beschaffen, so daß das Risiko der Inaktivierung der Neuraminidase bei Anwendung des eisenhaltigen (s. Kap. A.VI.), oxydasewirksamen Cytochrom c in Kauf genommen wurde.⁺

3) Enzymkinetik

a) Reaktionsgeschwindigkeiten

Enzym: an Rinderserumalbumin adsorbierte Neuraminidase mit einer spezifischen Aktivität von 11 640 E/mg Protein.

1. Reaktionsgeschwindigkeit mit Gangliosidgemisch aus gesundem menschlichem Gehirn.

Substratlösung: in 0.25 ml eines 0.2 m Kaliumacetatpuffers vom pH 4.9 sind 53.2 µg N-ANS in säure-hydrolytisch spaltbarer Bindung an Gangliosid enthalten (s. Kap. B.I.2.b; Ext₅₄₆ · 29 = µg N-ANS).

Enzymlösung: in 0.25 ml eines 0.001 m Kaliumphosphatpuffers vom pH 6.0 sind 11 Enzymeinheiten enthalten.

Inkubationslösung: Totalvolumen von 0.5 ml bestehend aus Substrat- und Enzymlösung.

Vergleichslösungen: 0.25 ml Enzymlösung mit 0.25 ml 0.2 m Kaliumacetatpuffer, pH 4.9; 0.25 ml Substratlösung mit 0.001 m Kaliumphosphatpuffer, pH 6.0.

Vergleichswerte: die Ext₅₄₆ der Enzymvergleichslösung (ohne Substrat) ist, abgelesen gegen n-Butanol-HCl (Aminoff) ± 0. Die Ext₅₄₆ der Substratlösung (ohne

⁺Herzlichen Dank an Herrn W. Minuth für die Überlassung von Cytochrom c und viele wertvolle technische Ratschläge (Institut für Allgemeine Botanik der Ruhr-Universität Bochum, Direktor Prof. Dr. Esser).

B. IV. Charakterisierung des Enzyms

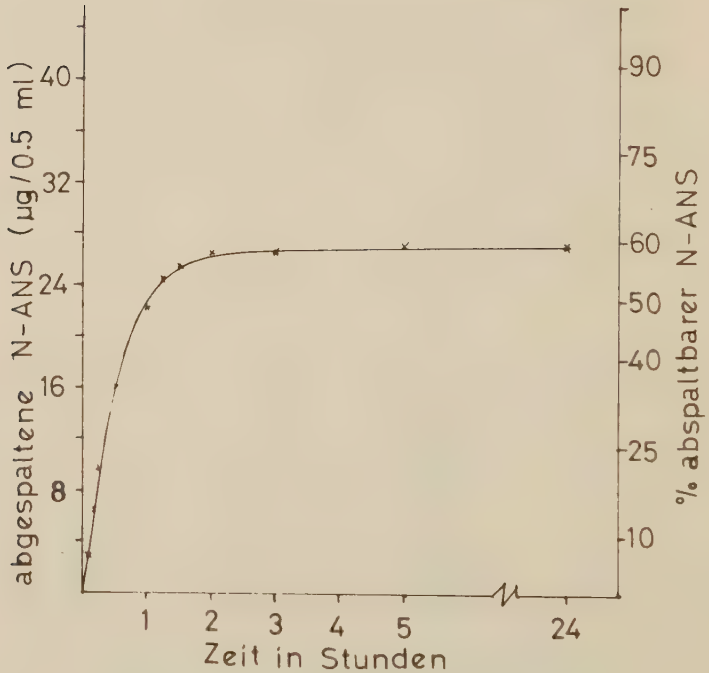
Enzym) ist, unabhängig von der Inkubationszeit bei 37°C, abgelesen gegen n-Butanol-HCl (Aminoff, s. Kap. B.I.1.b) 0.264, was einer Menge von 7.65 ug (Ext. • 29) an freier N-ANS bzw. von 14.4 % der vom Gangliosid säure-hydrolytisch abspaltbaren N-ANS entspricht, die unter Versuchsbedingungen nicht enzymatisch, sondern hydrolytisch freigesetzt wird.

Bei Anwendung der Bestimmungsmethode für freigesetzte N-ANS nach Aminoff dürfen also nicht 53.2 ug / 0.25 ml Substratlösung als 100 % hydrolytisch (enzymatisch) spaltbar angesehen werden, sondern nur 45.55 ug / 0.25 ml, denn alle nach enzymatischer Spaltung gefundenen Ext₅₄₆ (Aminoff) werden gegen den Vergleichswert der Substratlösung (ohne Enzym) als Nullwert abgelesen.

Inkubations - Dauer	Ext ₅₄₆ S.-V.	gg. Ext ₅₄₆ •29 =ug N-ANS	% abgesp. N-ANS von 45.55 ug total
5'	0.104	3.02	6.63
10'	0.219	6.35	13.94
15'	0.325	9.72	20.7
30'	0.551	16.0	35.4
60'	0.756	22.2	48.1
75'	0.840	24.36	49.7
90'	0.863	25.05	55.0
120'	0.912	26.45	58.0
3 h	0.920	26.68	58.5
5 h	0.930	27.0	59.8
24 h	0.929	26.95	59.0

Tabelle 15: S.-V. = Substrat - Vergleichswert (Leerwert enthaltend Substrat, kein Enzym).

B. IV. Charakterisierung des Enzyms



Figur 10: Reaktionsgeschwindigkeit von 11 E / 0.5 ml Neuraminidase-Albumin Adsorbat mit ca. 450 µg Rohgangliosid (Menschengehirn) pro Inkubationsmischung bei 37°C.

B. IV. Charakterisierung des Enzyms

Aus Figur 10 läßt sich ablesen, daß die enzymatische Spaltbarkeit des verwendeten Gangliosid offenbar nicht über 60 % hinausgeht. (Theoretische Erläuterung s.a. Kap. A.II.3 und A.IV.2). Die entscheidende Abflachung der Spaltungskurve ist schon nach 2 h erreicht. Es ist unwahrscheinlich, daß im verwendeten Neuraminidase - Präparat noch N-ANS - Aldolase aus der Cl.perfringens-Rohkultur als Verunreinigung enthalten ist (s. Kap. A. III.2), denn nach 24-stündiger Neuraminidasespaltung müßte die enzymatisch freigesetzte N-ANS von etwa vorhandener N-ANS - Aldolase in Brenztraubensäure und D-Mannosamin zerlegt worden sein. Nach 24 Stunden ist dagegen (s. Tab. 15) kein Abfall an freier N-ANS zu verzeichnen.

2. Reaktionsgeschwindigkeit mit voll-synthetisch dargestelltem α - Benzyl-Glykosid der N-ANS (71).

Das Substrat ist chromatographisch einheitlich und enthält nach dünn-schicht-chromatographischen Untersuchungen weniger als 0.5 % an freier, d.h. nicht glykosidisch gebundener N-ANS.

Substratlösung: in 0.25 ml eines 0.2 m Kaliumacetat-puffers vom pH 4.9 sind 95 ug N-ANS in glykosidischer Bindung enthalten (bestimmt als Gesamt-N-ANS nach Bial sowie als säure-hydrolytisch abspaltbare N-ANS nach Warren; s. Kap. B.I.2.b).

Enzymlösung: in 0.25 ml 0.001 m Kaliumphosphatpuffer pH 6.0 sind 92 Enzymeinheiten enthalten.

Inkubationslösung: Totalvolumen 0.5 ml aus 0.25 ml Substratlösung und 0.25 ml Enzymlösung.

Vergleichslösung: 0.25 ml Substratlösung mit 0.25 ml 0.001 m Kaliumphosphatpuffer, pH 6.0.

Vergleichswerte: Die Ext_{546} der Vergleichslösung sind unabhängig von ihrer Inkubationsdauer bei 37°C und

B. IV. Charakterisierung des Enzyms

ergeben, abgelesen gegen n-Butanol-HCl (Aminoff), einen konstanten Wert um $\text{Ext}_{546} = 0.55$, was bei Ext. 29) einer Menge von 15.95 ug freier N-ANS bzw. 16.8 % der in der Substratlösung α -glykosidisch an den Benzylrest gebundenen N-ANS entspricht, die unter Versuchsbedingungen bereits hydrolytisch freigesetzt wird.⁺

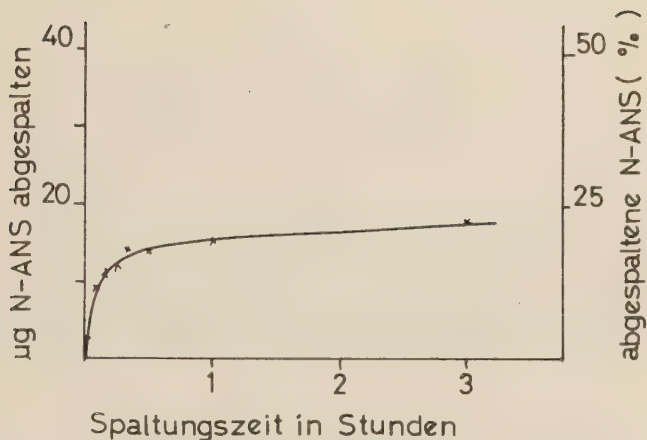
Bei Anwendung der Bestimmungsmethode für freie N-ANS nach Aminoff dürfen also nicht 95 ug N-ANS (Substratlösung) als 100 % enzymatisch spaltbar angesehen werden, weil sie wegen des hohen Vergleichswertes (Substratlösung ohne Enzym) nicht erfaßbar sind. Daher werden nur 95 - 15.95 ug = 79.05 ug N-ANS als 100 % enzymatisch abspaltbar im Versuch angenommen (s. Tab. 16; Fig. 11).

Inkubations - Dauer	Ext ₅₄₆ gg. S.-V.	Ext ₅₄₆ · 29 =ug N-ANS	% abgesp.N-ANS von 79.05 ug total
1'	0.083	2.41	3.05
5'	0.322	9.35	11.83
10'	0.399	11.57	12.10
15'	0.417	12.10	15.30
20'	0.491	14.23	18.00
30'	0.481	13.95	17.65
60'	0.527	15.29	19.33
180'	0.614	17.80	22.50

Tabelle 16: S.-V. = Substrat - Vergleichswert (Leerwert mit Substrat ohne Enzym).

⁺Über die Zunahme der Instabilität der Neuraminsäureglykoside mit zunehmender Größe des Aglykon, siehe Dissertation Blohm 1967 (Faillard u. Blohm (71)).

B. IV. Charakterisierung des Enzyms



Figur 11: Reaktionsgeschwindigkeit von 92 E/0.5 ml Neuraminidase-Albumin Adsorbat mit synthetischem α -Benzyl-Glykosid der N-ANS (enthaltend 79.05 ug abspaltbarer N-ANS).

3.b) Ermittlung der Michaeliskonstanten

Gangliosidgemisch aus gesundem, menschlichem Gehirn und synthetisches (Faillard und Blohm, unveröffentlicht (71)) α -Benzylglykosid der N-ANS dienen als Substrate für die an Albumin adsorbierte Neuraminidase aus Cl.perfringens.

Mit einer graphischen Methode nach Lineweaver und Burk (131) — Auftragen der Größen $[S]$ und $[S] / v$ in einem Diagramm — läßt sich die Michaeliskonstante K_m , d.h.

B. IV. Charakterisierung des Enzyms

diejenige Substratkonzentration $[S]$ (in Mol/l) ermitteln, bei der die halb-maximale enzymatische Umsatzgeschwindigkeit $v_{\max}/2$ herrscht:

$$(p) \quad \frac{[S]}{v} = \frac{1}{v_{\max}} \cdot [S] + \frac{K_m}{v_{\max}}$$

$$(q) \quad K_m = \frac{[S]}{v} \cdot v_{\max} - [S]$$

$$(r) \quad K_m = \text{---} [S] \text{ bei } \frac{[S]}{v} = 0.$$

Der Schnittpunkt der Geraden (p) mit der $[S]$ - (= x-) Achse zeigt somit den Betrag von $K_m = \text{---} [S]$ an.

Vereinfacht man den Ausdruck (p) zu $y = a x + b$, so lassen sich Anstieg a und Schnittpunkt b der Geraden mit der y-Achse wie folgt ausdrücken und im Zuge der Regressionsrechnung der experimentell ermittelten Punkte dieser Geraden errechnen:

$$(s) \quad a = \frac{\sum y (x - \bar{x})}{\sum (x - \bar{x})^2}$$

$$a \text{ (Anstieg) bedeutet in (p) } \frac{1}{v_{\max}}$$

$$(t) \quad b = \bar{y} - a \cdot \bar{x}.$$

$$b \text{ (Ordinatenschnittpunkt) bedeutet in (p) } \frac{K_m}{v_{\max}}.$$

Setzt man $y = 0$ (entsprechend $\frac{[S]}{v} = 0$), so läßt sich der Schnittpunkt der Geraden mit der x-Achse (K_m ; - $[S]$) wie folgt ausdrücken:

$$(z) \quad x_{(y=0)} = \text{---} \frac{b}{a}.$$

Die Substratkonzentrationen werden über ihren N-ANS-Gehalt ermittelt und in $[S]$ mMol/l angegeben; die Umsatzgeschwindigkeiten v werden aus der Konzentration

B. IV. Charakterisierung des Enzyms

der über die Aminoff-Reaktion bestimmten, enzymatisch freigesetzten N-ANS erhalten und ebenfalls in mMol/l angegeben.

1 μ g N-ANS/0.5 ml = $6.49 \cdot 10^{-6}$ Mol/l oder 0.00649 mMol/l.

Enzym: Neuraminidase - Albumin Adsorbat mit 11 640 E/mg Protein (spezifische Aktivität);
0.25 ml für jede Inkubationslösung enthalten
92 E in 0.001 m Kaliumphosphatpuffer, pH 6.0.

Substratlösungen:

Gangliosid: 40.025 mg in 10 ml 0.2 m Kaliumacetatpuffer pH 4.9 gelöst enthalten 11.7 % N-ANS (säurehydrolytisch nach Warren (190) abspaltbar); also 4680 μ g N-ANS als [S] .

α -Benzylglykosid der N-ANS: 3.38 mg glykosidisch gebundener N-ANS (bestimmt nach Bial und säure-hydrolytischer Abspaltung nach Warren (190)) sind in 3 ml 0.2 m Kaliumacetatpuffer pH 4.9 enthalten.

Von den Substratlösungen werden Verdünnungen in absteigender Konzentration hergestellt, drei Lösungen ad 0.25 ml jeder Verdünnungsstufe: zwei davon zur Doppelbestimmung, und eine als "Substratleerwert".

Inkubationsmischungen: 0.5 ml Totalvolumen bestehend aus je 0.25 ml einer Substratverdünnung und 0.25 ml Enzymlösung werden genau 15 Min. bei 37°C inkubiert, ebenso die

"Substratleerwerte" bestehend aus 0.25 ml je einer Substratverdünnungsstufe und 0.25 ml 0.001 m Kaliumphosphatpuffer.

Nach Inkubation der Lösungen wird die freigesetzte N-ANS nach Aminoff bestimmt. Zur Ermittlung der reinen enzymatischen Abspaltung werden die optischen Dichten der Inkubationsmischungen gegen diejenigen der entsprechenden "Substratleerwerte" bei 546 m μ abgelesen.

B. IV. Charakterisierung des Enzyms

Substrat- verdün- nung N ^o	Ggls.-geb. N-ANS ug/ 0.5 ml	mMol Ggls./l = [S]	Glykosid- geb.N-ANS ug/0.5 ml	mMol Gly- kosid /l = [S]
1	117	0.759	281.7	1.826
2	93.6	0.607	225.3	1.460
3	70.3	0.456	140.9	0.914
4	46.8	0.304	112.7	0.731
5	23.4	0.152	70.4	0.457
6			35.2	0.229
7			17.6	0.114

Tabelle 17: Substratverdünnungen [S] in mMol/l von Gangliosid aus normalem menschlichem Gehirn und synthetischem α -Benzylglykosid der N-ANS zur Bestimmung der Michaeliskonstanten (Substratkonzentrationen in 0.5 ml Inkubationsmischung).

Nach Inkubation der Mischungen (15 Min. 37°C) ergeben sich folgende enzymatische Abspaltungsraten in ug N-ANS/0.5 ml, umgerechnet in mMol N-ANS/l = v:

N ^o	von Ggls. gespaltene ug N-ANS/0.5 ml	v = mMol/l	von Glykosid gespaltene N-ANS ug/0.5 ml	v = mMol/l
1	56.45	=0.366	31.40	=0.204
2	51.60	=0.335	28.72	=0.186
3	42.40	=0.275	22.62	=0.147
4	32.25	=0.209	18.46	=0.120
5	18.67	=0.121	12.87	=0.084
6			6.52	=0.042
7			3.89	=0.025

Tabelle 18: Ermittlung der Größen v : enzymatische Abspaltungsrate (mMol/l) nach Inkubation von Gangliosid und α -Benzylglykosid der N-ANS.

B. IV. Charakterisierung des Enzyms

Aufstellung der Größen $[S]$ und $\frac{[S]}{v}$ zur Berechnung der Michaeliskonstanten und Eintragung in die Diagramme (Fig. 12 und 13):

N ^o	Gangliosid			α -Benzylglykosid		
	$[S] \text{ (mMol/l)}$	$\frac{[S]}{v}$	$\frac{[S]^+}{v}$	$[S] \text{ (mMol/l)}$	$\frac{[S]}{v}$	$\frac{[S]^+}{v}$
1	0.759	2.075	2.046	1.826	8.93	8.75
2	0.607	1.815	1.848	1.460	7.83	7.88
3	0.456	1.658	1.653	0.914	6.21	6.59
4	0.304	1.454	1.454	0.731	6.14	6.16
5	0.152	1.255	1.257	0.457	5.47	5.51
6				0.229	5.4	4.97
7				0.114	4.53	4.7

Tabelle 19: ⁺ = Werte nach Regressionsrechnung der aus $[S] \mid \frac{[S]}{v}$ zusammengesetzten Punkte der Geraden (p) für Gangliosid und α -Benzylglykosid.

Errechnung der Michaeliskonstanten nach den Gleichungen (s), (t) und (z):

$$\begin{aligned} 1) \text{ Gangliosid: } a &= 1.3 \cdot 10^3 \text{ l/Mol} \\ b &= 1.059 \end{aligned}$$

$$x_{(y=0)} = -\frac{b}{a} = -\frac{1.059}{1.3 \cdot 10^3} = -0.82 \cdot 10^{-3} \text{ Mol/l}$$

Die Michaeliskonstante mit Gangliosid als Substrat ist

$$K_m = 0.82 \cdot 10^{-3} \text{ Mol/l}$$

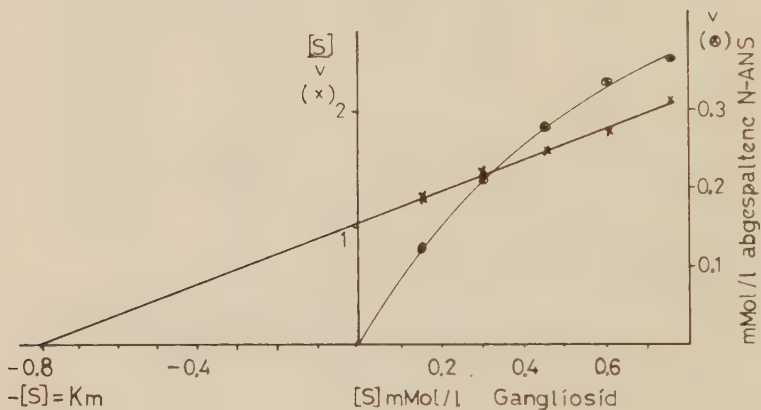
2) α -Benzylglykosid:

$$\begin{aligned} a &= 2.4 \cdot 10^3 \text{ l/Mol} \\ b &= 4.43 \end{aligned}$$

$$x_{(y=0)} = -\frac{b}{a} = -\frac{4.43}{2.4 \cdot 10^3} = -1.85 \cdot 10^{-3} \text{ Mol/l}$$

B. IV. Charakterisierung des Enzyms

Die Michaeliskonstante mit dem α -Benzylglykosid
der N-ANS ist $K_m = 1.85 \cdot 10^{-3} \text{ Mol/l}$.

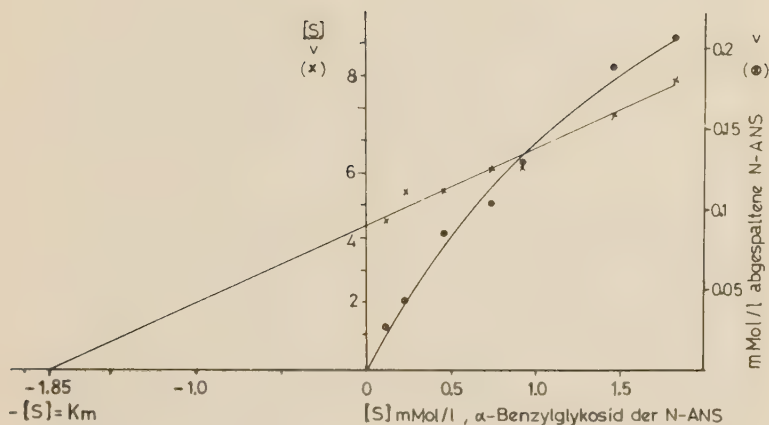


Figur 12: Michaeliskonstante K_m der Cl. perfringens-Neuraminidase mit menschlichem Gangliosidgemisch $[S]$.

Die Gerade $[S]$ gegen $\frac{[S]}{v}$ schneidet die Abszisse bei $-[S] = K_m$.

$[S]$ gegen v aufgetragen zeigt den Einfluß der Gangliosid - Konzentration auf die enzymatische Abspaltungsrate.

B. IV. Charakterisierung des Enzyms



Figur 13: Michaeliskonstante K_m der Cl. perfringens-Neuraminidase mit dem synthetischen α -Benzylglykosid der N-ANS, ermittelt nach Lineweaver und Burk (131) durch Auftragen der Größen $[S]$ und $[S]/v$.

Die Gerade schneidet die Abszisse bei $-[S] = K_m$.

$[S]$ gegen v aufgetragen zeigt den Einfluß der α -Benzylglykosid - Konzentration auf die enzymatische Abspaltungsrate.

B. V. Diskussion der experimentellen Ergebnisse

Zur Erklärung der Erscheinung, daß die Neuraminidase eines zwei Jahre gelagerten Rohenzympräparates aus Cl. perfringens bei Gelfiltration in mehrere Fraktionen aufgetrennt wird, führen Cassidy et al. (45) an, daß das Enzym als kleine molekulare Einheit die Fähigkeit zur Aggregation besitzen müsse (s. Kapitel A.IV.). Nach den im folgenden beschriebenen Ergebnissen (s.a. Kap. B.IV.1 und 2) ist das Neuraminidase - Molekül aus Cl.perfringens ungewöhnlich klein und scheint im Gemisch mit Nicht - Enzymeiweiß, d.h. in unreiner Form, kaum zu aggregieren; vielmehr vermag es durch Adsorption an diese Fremdproteine verschieden hohe Molekulargewichte vorzutauschen. So muß die nach Cassidy et al. (45) nach Gelfiltration frischen Rohenzym auf Sephadex G-75 gereinigte Neuraminidase ein beträchtlich hohes Molekulargewicht aufweisen, "da sie vor dem Hauptanteil der Proteine eluierte" (s. Kap. B.IV.1). Die beiden hier beschriebenen Enzymmaxima nach Gelfiltration eines länger gelagerten Rohenzym haben Molekulargewichte von ca. 200 000 bzw. 450 000 (s. Kap. A.IV. Fig. 6). Bei einer Rechromatographie im Gemisch mit Rinder Serumalbumin ("a grade", Calbiochem) konnten ihre Elutionsvolumina mit denen des monomeren (MG 67 000) und dimeren (MG 134 000) Albumin verglichen werden. Die Neuraminidase befand sich jedoch nach der Rechromatographie nicht mehr an der beschriebenen Stelle der "Enzymmaxima" im Elutionsdiagramm, sondern war vollständig an die Fraktion des monomeren Albumins adsorbiert. Filtriert man nun dieses Neuraminidase - Albumin Adsorbat erneut auf einem Sephadex Geltyp, diesmal im Gemisch mit Cytochrom c (MG 12 400), so entsteht

B. V. Diskussion der experimentellen Ergebnisse

ein weiteres Adsorbat des Enzyms an das Protein des Cytochroms. Eine genaue Aussage über die spezifische Aktivität der an Albumin gebundenen Neuraminidase ist aus den in Kap. B.IV.1.a. genannten Gründen nicht möglich. Das Enzym ist hier jedoch an ein kristallines, electrophoretisch reines Rinderserumalbumin adsorbiert. Es ist mit einiger Sicherheit frei von sonstigen Fremdproteinen und Verunreinigungen aus den Kulturmedien des *Cl.perfringens*; letzteres darf mit noch höherer Wahrscheinlichkeit für die an das Cytochrom c adsorbierte Neuraminidase gelten.

Frisch von *Cl.perfringens* gebildete Neuraminidase zeigt nur einen Peak bei Gelfiltration auf Sephadex G-75, der auf die Bindung an nur ein hochmolekulares Protein der Kultur schließen läßt (s. Kap. B.I.6 und B. III.1.c), während das länger gelagerte Rohenzym eine Adsorption an mehrere Proteine des Kulturmediums erkennen läßt, was aus dem Auftreten mehrerer Gipfel erkennbar ist (45).

Um die Frage zu beantworten, ob das frische Rohenzympräparat nur das eine, hochmolekulare Protein, an das die Neuraminidase adsorbiert ist, enthält, oder ob es primär die in Kapitel B.III.1.c und B.III.2 ermittelte Proteinverteilung des älteren Rohenzympräparates aufweist, wären nähere Untersuchungen über den Proteingehalt des frischen Rohenzympräparates erforderlich. Dabei müßte sich herausstellen, ob das Protein innerhalb zweier Jahre hydrolytisch in kleinere Bruchstücke zerfällt, an die das Enzym weiterhin adsorbiert ist. Träfe es aber zu, daß sich

B. V. Diskussion der experimentellen Ergebnisse

die Proteinverteilung beim Lagern nicht ändert, so können die hier beschriebenen Beobachtungen als Hinweis darauf gelten, daß die Adsorptionsfähigkeit der Neuraminidase an Proteine erst mit der Zeit verstärkt in Erscheinung tritt. Eine Klärung dieser Frage dürfte ein Versuch erbringen, indem man Neuraminidase eines frisch gewonnenen Rohenzympräparates ebenfalls mit einem definierten Protein zusammen chromatographiert, um eine Adsorption zu erreichen.

Das Neuraminidase-Cytochrom c Adsorbat (s. Kap. B. IV.1.c), dessen Verhalten sich bei der Gelfiltration nicht sonderlich von dem des Cytochrom c allein unterscheidet (s. Kap.B.IV.2), darf als schlüssiger Beweis dafür gelten, daß die Molekülgröße der Neuraminidase aus Cl.perfringens diejenige des Cytochrom c (MG 12 400) zumindest nicht übersteigt und wahrscheinlich sogar weit darunter liegt. Die mit Hilfe der Gelfiltrationsmethode zur Ermittlung der Molekulargewichte gefundenen Werte (s. Kap.B.IV.2) lassen auf ein mittleres Molekulargewicht der Neuraminidase von ca. 2 000 schließen.

Ein so kleines Protein dürfte in verdünnter Lösung, beim Einfrieren und Auftauen in Salzlösungen, durch Dialyse oder Lyophilisieren nicht so leicht denaturiert werden wie ein hochmolekulares Protein. Für die Neuraminidase bedeutet daher die Inaktivierung durch obengenannte Operationen (s.a. Kap. B.III.1.a und 1.c), daß nicht das Enzymprotein als Ganzes geschädigt wird, sondern nur die enzymatische Wirk-

B. V. Diskussion der experimentellen Ergebnisse

gruppe selbst oder einer ihrer funktionellen Teile. Stabil ist das Enzym dagegen in protein-reichem Medium, sei es zusammen mit den Fremdproteinen der Nährbouillon (s. Kap. B.III.2) und definierten Proteinen wie Albumin (s. Kap. B.IV.1.b), sei es in konzentrierter, reiner Form (s. Kap. A. VI.).

Die Neuraminidaseaktivität des zwei Jahre bei 4°C und -20°C gelagerten Rohenzympräparates war anschließend um das ca. 20-fache ihres ursprünglichen Wertes angestiegen. Diese Beobachtung wurde auch von Cassidy et al. gemacht (45). Die Autoren diskutierten eine reversible Polymerisation des Enzyms, eine Erklärung, die für das Rohenzympräparat wahrscheinlich nicht zutrifft. Eher scheint die Neuraminidase hier langsam vom jeweiligen Trägerprotein zu dissoziieren, wobei die enzymatischen Wirkgruppen, die im Adsorbat durch Fremdprotein verdeckt liegen, frei würden. Die Möglichkeit der reversiblen Aggregation der Enzymmoleküle in reinen Neuraminidasepräparaten, die auch Mohr und Schramm (145) diskutierten (s.a. Kap. A.VII.), bleibt davon unberührt, weil in solchen reinen Enzympräparaten kein Fremdprotein als Adsorbens auftritt.

Als Arbeitshypothese ließe sich daraus ableiten, daß derjenige Teil der enzymatischen Wirkgruppe am Neuraminidasmolekül, der für das Zustandekommen des Enzym-substratkomplexes verantwortlich ist, auch mit einem Carboxyl-, Amino- oder Hydroxylrest, die in gewisser Menge in jedem Protein vorhanden sind, völlig unspezifisch in Verbindung treten kann. In dieser Verbindung wäre das Enzym kompetitiv gehemmt, weil es mit

B. V. Diskussion der experimentellen Ergebnisse

einem nicht spezifischen Körper eine "enzym"-spezifische Verbindung eingegangen ist, aus der es nur schwer und unter unbekannten Bedingungen wieder abdissoziiert. Nach den Befunden dieser Arbeit wird ein hochmolekularer Neuraminidase - Protein Komplex durch Zugabe eines kleineren Proteins, das eine große Gesamtoberfläche hat und dessen Acceptorgruppe für das Enzym daher auf engerem Raume konzentriert ist, dissoziiert und das Enzym an dieses kleinere Protein weitergereicht. Durch die relativ feste Bindung der Neuraminidase mit ihrer spezifischen Enzymgruppe an das Protein wäre auch die hohe Stabilität der enzymatischen Aktivität in solchen Komplexen erklärbar, da die Wirkgruppe des Enzyms geschützt liegt. Die Neuraminidase - Fremdprotein-komplexe sind weder in hochkonzentrierter Salzlösung (s. Kap. B.IV.1.b) noch durch Chromatographie auf Ionenaustauschern (DEAE-Sephadex; *Trichomonas foetus* - Neuraminidase: Romanovska et al. (158)) dissoziierbar und täuschen auf diese Weise verschiedene Enzyme vor.

Gegen diese Hypothese spricht, daß das Enzym bei Zugabe von Substrat offenbar nicht sogleich in vollem Umfange aus dem Adsorbat mit Fremdprotein gelöst wird. Dies wäre zu erwarten, weil die Acceptorgruppe des Substrates für das Enzym die höhere Affinität besitzen sollte. Vielmehr entfaltet die Neuraminidase unabhängig davon ihre volle Aktivität erst nach den bei Cassidy et al. (45) beschriebenen Zeiträumen von ungefähr zwei Jahren.

B. V. Diskussion der experimentellen Ergebnisse

Durch die spezifische Adsorption der V.cholerae - Neuraminidase an Erythrocytenstroma (Schramm und Mohr (162) kann eine kleinmolekulare (MG 8 000), von Fremdproteinen freie Neuraminidase gewonnen werden. Es müßte geprüft werden, ob diese spezifische Reinigungsmethode, die Jamieson (103) auch an Diphtherie - Toxin Neuraminidase unlängst erprobte, sich für die Neuraminidase aus Cl.perfringens ebenfalls zur Reindarstellung eignet.

Die Unabhängigkeit der Neuraminidase aus Cl.perfringens von Calcium- oder anderen zweiwertigen Ionen in ihrer enzymatischen Wirkung konnte erneut sowohl für das Rohenzym als auch für hoch gereinigte und an Fremdprotein (Albumin) adsorbierte Neuraminidase (s.a. Kap. A.VI.) bestätigt werden, indem das Enzym in 0.001 m NaEDTA-Puffer mehrmals auf Molekularsieben chromatographiert und danach keine Beeinträchtigung der enzymatischen Aktivität festgestellt wurde. Eine Aktivierbarkeit des Enzyms durch irgendwelche Ionen wurde nicht geprüft. An dieser Stelle sei aber nochmals auf die Rosenberg'sche Hypothese zur V.cholerae-Neuraminidase (160) hingewiesen, daß Calciumionen als Liganden zwischen Carboxylgruppen des Enzyms und derjenigen der N-Acylneuraminsäure fungieren. Bei der Cl.perfringens-Neuraminidase wurde bisher nicht geprüft, ob vielleicht Calciumionen in fester Bindung am Enzymprotein vorliegen, die aus diesem Verband mit EDTA nicht herausgelöst werden können.

Mit dem an Rinderserumalbumin adsorbierten Enzym wurden Reaktionsgeschwindigkeiten und Michaelis-

B. V. Diskussion der experimentellen Ergebnisse

konstanten ermittelt: mit Gangliosidgemisch (Rohgangliosid) aus gesundem menschlichen Gehirn Abspaltung von 59 % der N-ANS in 24 h, $K_m = 0.8 \cdot 10^{-3}$; mit dem synthetischen α -Benzylglykosid der N-ANS (71) Abspaltung von 22.5 % der N-ANS in 3 h, $K_m = 1.9 \cdot 10^{-3}$.

B. VI. Zusammenfassung

Neuraminidase aus *Clostridium perfringens* (Cl. welchii, Gasbrand) wurde als Rohenzympräparat durch Konzentrierung der Proteine des Kulturfiltrates gewonnen. Wegen der Adsorption des Enzyms an die Fremdpoteine des Rohenzympräparates war mit Hilfe der Gelfiltrationstechnik an Sephadex G-75 und G-200 - Typen (AB, Pharmacia, Uppsala, Schweden) nur eine Teilisolierung von angereicherter Neuraminidase möglich. Durch weitere Gelfiltration dieses vorge-reinigten Enzyms zusammen mit Rinderserumalbumin (a grade, Calbiochem) ließ sich ein von Fremdproteinen und anderen Verunreinigungen freies Neuraminidase-Albumin Adsorbat gewinnen, das bei Rechromatographie in 1 n NaCl - Lösung nicht dissoziierte. Gelfiltration des Neuraminidase-Albumin Adsorbates zusammen mit Cytochrom c (Boehringer, Mannheim) ergab eine weitere Adsorption der Neuraminidase an das Cytochrom bei gleichzeitiger Spaltung des Neuraminidase-Albumin Komplexes. Mit der Gelfiltrationsmethode zur Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinen wurde die Größe des Neuraminidase-Moleküls bestimmt. Danach kann angenommen werden, daß die Molekülgröße der Neuraminidase weit unter 10 000 liegt. Durch Chromatographie der Neuraminidase in 0.001 m Na-EDTA wurde ihre enzymatische Aktivität nicht beeinflußt. Das Enzym erwies sich damit als unabhängig von Calcium-Ionen. Nach zweijähriger Lagerung des Rohenzympräparates in eingefrorenem Zustand wurde eine Steigerung der Neuraminidase-Aktivität festgestellt. Reine Neuraminidase im Verband mit Rinderserumalbumin erwies sich als relativ stabil in Lösungen mit hoher Salzkonzentration, beim Einfrieren und Auftauen sowie beim Lyophilisieren.

B. VI. Zusammenfassung

Mit der an Rinderserumalbumin adsorbierten Neuramidase wurden Reaktionsgeschwindigkeiten und Michaeliskonstanten mit Gangliosidgemisch aus normalem, menschlichem Gehirn ($K_m = 0.8 \cdot 10^{-3}$) und einem synthetischen α -Benzylglykosid der N-Acetylneuraminsäure ($K_m = 1.9 \cdot 10^{-3}$) (71) ermittelt.

LITERATURNACHWEIS

- (1) ADA, G.L.: Biochemica et Biophysica Acta
73 : 276 (1963)
- (2) ADA, G.L. and E.L. FRENCH: Nature (Lond.)
183 : 1740 (1959)
- (3) ADA, G.L. and E.L. FRENCH: J. Gener.Microbiol.
21 : 561 (1959)
- (4) ADA, G.L., E.L. FRENCH and P.E. LIND: J. Gener.
Microbiol. 24 : 409 (1961)
- (5) ADA, G.L. and P.E. LIND: Nature 190:1169 (1961)
- (6) ADA, G.L. and B.T. PERRY: Austral.J.Exp.Biol.
32 : 453 (1964)
- (7) ADA, G.L. and J.D. STONE: Brit.J.exp.Biol.Med.
68 : 385 (1948)
- (8) ADAMS, E.: J.Biol.Chem. 164 : 461 (1947)
- (9) AMINOFF, D.: Biochem.J. 81 : 384 (1961)
- (10) ANDERSON, S.G.: Austral.J.exp.Biol.Med.Sci.
26 : 347 (1948)
- (11) ANDREWES, C.H., F.B. BANG and F.M. BURNET:
Virology 1 : 176 (1955)
- (12) ANDREWS, P.: Biochem.J. 91 : 222 (1964)
- (13) AUGUSTINSSON, K.-B. and G.EKEDAH: Biochem.
Biophys.A. 56 : 392 (1962)
- (14) BABA, T., M. ISHII and K.ACKI: Gann
55 : 331 (1964)
- (15) BARANOWSKI, T., E.LISOWSKA, A.MORAWIECKI, E.RO-
MANOWSKA u. I.K. STOCZEKA: Arch.Immunol.Terap.
Dosw. 7 : 15 (1959)
- (16) BARRY, G.T. and W.F. GOEBEL: Nature
179 : 206 (1957)

LITERATURNACHWEIS

- (17) BEAVEN, G.H. and E.R. HOLIDAY: Adv.Prot.Chem.
7 : 352 (1952)
- (18) BEISENHERZ, G., H.J. BOLTZE, Th. BÜCHER, R. CZOK,
K.H. GARBADÉ, E. MEYER-ARENDT und G. PFLEIDERER:
Z.Naturforschg.
8 b: 555 (1953)
- (19) BERGMANN, F.H., L. LEVINE and R.G. SPIRO:
Biochem. Biophys. Acta 58 : 41 (1962)
- (20) BHAVANANDAN, V.P., E. BUDDECKE, R. CARUBELLI and
A. GOTTSCHALK: Biochem. Biophys. Res.Comm.
16 : 333 (1964)
- (21) BLIX, G.: Z. Physiol.Chem. 240 : 43 (1940)
- (22) BLIX, G., L. SVENNERHOLM and J. WERNER:
Acta Chem.Scand 6 : 358 (1952)
- (23) BLIX, G., A. GOTTSCHALK and E. KIENK: Nature
179 : 1088 (1957)
- (24) BLUMBERG, B.S. and L. WARREN: Biochem.Biophys.Acta
50 : 90 (1961)
Clin.Res. 8 : 372 (1960)
- (25) BORECKY, L.: Acta Virol. (Engl.)
2 : 73 (1958)
- (26) BOSCHMANN, F.A.G. and J. JACOBS: Biochem.Zeitschr.
342 : 532 (1965)
- (27) BOURILLON, R., R. GOT and R. MARCY: Nature
184 : 983 (1959)
- (28) BRIODY, E.A.: J. Immunol. 59 : 115 (1948)
- (29) BROSSNER, R. und K. Walter: Klin.Wschr.
1958 : 925
- (30) BRUNETTI, P., G.W.JOURDIAN and S. ROSEMAN:
J.Biolog.Chem. 237 : 2447 (1962)
- (31) BRUNETTI, P., A. SWANSON and S. ROSEMAN in
S.P. Colowick and N.O. Kaplan (Editors): Me-
thods in Enzymology Vol.VI, p.465; Academ.
Press Inc., N.Y. 1963
- (32) BURNET, F.M.: Austral.J.exp.Biol.med.Sci.:
20 : 81 (1942)

LITERATURNACHWEIS

- (33) BURNET, F.M., J.F. McCREA and J.D. STONE:
Brit.J.exp.Path. 27 : 228 (1946)
- (34) BURNET, F.M., J.F. McCREA and S.G.ANDERSON:
Nature 160 : 404 (1947)
- (35) BURNET, F.M. and J.D. STONE: Austral.J.exp.
Biol.med.Sci. 25 : 227 (1947)
- (36) BURNET, F.M.: Austral.J.exp.Biol.med.Sci.
26 - 371 (1948)
- (37) BURNET, F.M.: Austral.J.exp.Biol.med.Sci.
26 : 381 (1948)
- (38) BURNET, F.M.: Austral.J.exp.Biol.med.Sci.
27 : 217 (1949)
- (39) BURNET, F.M.: Physiol.Rev. 31 : 131 (1951)
- (40) BURNET, F.M.: Proc.R.Soc.London (8)
138 : 47 (1951)
- (41) BURTON, R.M.: J.Neurochem. 10 : 503 (1963)
- (42) CAMPBELL, B.J., R.J. SCHLUETER, G.F. WEBER and
W.F. WHITE: Biochem.Biophys.Acta 46 : 279 (1961)
- (43) CARUBELLI, R., L.D. RYAN, R.E. TRUCCO and
R.CAPUTTO: J.Biolog.Chem. 236 : 2381 (1961)
- (44) CARUBELLI, R., R.E. TRUCCO and R. CAPUTTO:
Biochem.Biophys.Acta 60 : 196 (1962)
- (45) CASSIDY, J.F., G.W. JOURDIAN and S. ROSEMAN:
Amer.J.Biol.Chem. 240 : 3501 (1965)
- (46) CASSIDY, J.F., G.W. JOURDIAN and S. ROSEMAN:
Bacteriol.Proc. 63 : 1962
- (47) CHU, C.M.: Nature 161 : 606 (1948)
- (48) COLLEE, J.G.: J.Path.Bact. 90 : 13 (1965)
J.Am.Chem.Soc.
- (49) COMB, D.G. and S. ROSEMAN: J.Am.Chem.Soc.
80 : 497 (1958)
- (50) COMB, D.G. and S. ROSEMAN: Amer.J.Biol.Chem
235 : 2529 (1960)

LITERATURNACHWEIS

- (51) COMB, D.G., F. SHIMIZU and S. ROSEMAN:
J.Am.Chem.Soc. 81 : 5513 (1959)
- (52) VIth CONGRESS OF BIOCHEMISTRY, N.Y. 1964,
Vol.VI, p.5: S. ROSEMAN; Acad.Press, N.Y. 1964
- (53) CURTAIN, C.C.: Austral.J.exp.Biol.med.Sci.
31 : 623 (1953)
- (54) DARELL, R.W. and C. HOWE: Proc.Soc.exp.Biol.Med.
116 : 1091 (1964)
- (55) DEWITT, C.W. and E.A. ZELL: J.Bact.
82 : 849 (1961)
- (56) DIXON, M.: Biochem.J. 54 : 457 (1953)
- (57) DRZENIEK, R.: Biochem.Biophys.Res.Comm.
26 : 631 (1967)
- (58) DRZENIEK, R., K. BÖGEL and R. ROTT: Virology
31 : 725 (1967)
- (59) ECOBICHON, D.J. and W. KALOW: Canad.J.Biochem.
Physiol. 41 : 969 (1963)
- (60) EDNEY, M.: Austral.J.exp.Biol.med.Sci.
27 : 253 (1949)
- (61) EMPFEHLUNGEN DER INTERNATIONALEN VEREINIGUNG DER
BIOCHEMIE (1964) zur Nomenklatur und Klassifizie-
rung von Enzymen in: "Comprehensive Biochemistry",
Band 13;
FLORKIN, M. und E.H. STOTZ (Editoren), Academ.
Press, New York 1966
- (62) FAILLARD, H.: Z.Physiol.Chemie 305 : 145 (1956)
- (63) FAILLARD, H.: Z.Physiol.Chemie 307 : 62 (1957)
- (64) FAILLARD, H.: Z.Physiol.Chemie 317 : 257 (1959)
- (65) FAILLARD, H. und H. STICKL: Z.Physiol.Chemie
319 : 220 (1960)
- (66) FAILLARD, H., W. PRIBILLA und H.F. POSTH:
Z.Physiol.Chemie 327 : 100 (1962)
- (67) FAILLARD, H. und W. PRIBILLA: Klin.Wschr.
1964: 686

LITERATURNACHWEIS

- (68) FAILLARD, H.: Hoppe-Seylers Z.Physiolog.Chemie
(Handbuch) 1965
- (69) FAILLARD, H.: Vortrag bei den Farbenwerken
Bayer AG, Leverkusen, am 14.4.1966
- (70) FAILLARD, H., G.KIRCHNER und M. BLOHM: Z.Physiol.
Chemie 347 : 87 (1966)
- (71) FAILLARD, H. und M. BLOHM 1967 (unveröffentlicht)
- (72) FISHKIN, A.F., R.W. TURNER and G.S. BERENSON:
Nature 207 : 876 (1965)
- (73) FLODIN, P.: J.Chromatograph. 5 : 103 (1961)
- (74) FOLCH-PI, J. and M. LEES: Amer.J.Dis.Child
97 : 730
- (75) FONTANGES, R., J. GARRIGUE et L.COLOBERT:
Ann.Inst.Pasteur 106 : 894 (1964)
- (76) FRANCIS, T.: J.Exp.Med. 85 : 1 (1947)
- (77) FRENCH, E.L. and G.L. ADA: Austral.J.exp.Biol.
32 : 165 (1954)
- (78) FRENCH, E.L. and G.L. ADA: J.Gener.Microbiol.
21 : 550 (1959)
- (79) FRIEDENREICH, V.: C.R.Soc.Biol. 96 : 1079 (1927)
- (80) FRIEDEWALD, W.F. and E.G. PICKELS: J.Exp.Med.
79 : 301 (1944)
- (81) GIBBONS, R.A. and G.L. Cheeseman: Biochem.Biophys.
Acta 56 : 354 (1962)
- (82) GOT, R. and R. BOURILLON: Nature 189 : 234 (1961)
- (83) GOTTSCHALK, A. in: "The Chemistry and Biology of
Sialic Acids" Cambridge 1960, p. 100
- (84) GOTTSCHALK, A. in: "The Enzymes", Vol.II, p.461,
Academic Press N.Y. 1960; BOYER, P.D., H. LARDY
and K.MYRBÄCK (Editors)
- (85) GOTTSCHALK, A.: Nature 186 : 949 (1960)

LITERATURNACHWEIS

- (86) GOTTSCHALK, A. and E.R.B. GRAHAM: Biochem.
Biophys. Acta 34 : 380 (1959)
- (87) GOTTSCHALK, A. and P.E. LIND: Nature
164 : 232 (1949)
- (88) GOTTSCHALK, A. and B.T. PERRY: Brit.J.exp.Path.
32 : 408 (1951)
- (89) GOTTSCHALK, A., W.K. WHITTEN and E.R.B. GRAHAM:
Biochem.Biophys. Acta 38: 183 (1960)
- (90) GRAHAM, E.R.B. and A. GOTTSCHALK: Biochem.
Biophys.Acta 38 : 513 (1960)
- (91) HAAS, R. und G. MAAS in: "Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie" von REIFLOH, H. und H.-J. OTTE (Editoren), Fischer-Verlag Stuttgart 1965
- (92) HAING, M.: Proc.Soc.exp.Biol.Med.68 : 385 (1948)
- (93) HEIMER, R. and K. MEYER: Proc.Natl.Acad.Sci,USA
26 : 355 (1948)
- (94) HENLE, W., G. HENLE, V. GROUPE and L.A.CHAMBERS:
J.Immunol. 48 : 163 (1944)
- (95) HEYWORTH, R. and J.S.D. BAKON: Biochem.J.(London)
66 : 41 (1957)
- (96) HIRST, G.K.: Science (New York) 94 : 22 (1941)
- (97) HIRST, G.K.: J.exp.Med. 75 : 49 (1942)
- (98) HIRST, G.K.: J.exp.Med. 76 : 195 (1942)
- (99) HOWE, C., L.T. LEE and H.M.ROSE: Arch.Biochem.
Biophys. 95 : 512 (1961)
- (100) HOWE, C., J.D. MacLENNAN, J. MANDL and E.A.KABAT:
J.Bacteriol. 74 : 365 (1957)
- (101) HOWE, C., H.M. Rose and L. SCHNEIDER: Proc.Soc.
exp.Biol.Med.96 : 88 (1957)
- (102) HUGHES, R.C. and R.W. JEANLOZ: Biochemistry
3 : 1535 (1964)
- (103) JAMILSON, G.A.: Biochem.Biophys.Acta
121 : 326 (1966)

LITERATURNACHWEIS

- (104) JERUSEALMY, J., D. DANON, A. KOHN and A. DevRIES:
Vox Sanguinis, Basel 4 : 292 (1959)
- (105) KLEMPERER, H.G.: Virology 12 : 540 (1960)
- (106) KLENK, E.: Z.Physiol.Chemie 268 : 50 (1941)
- (107) KLENK, E.: Z.Physiol.Chemie 273 : 67 (1942)
- (108) KLENK, E. und H. FAILLARD: Z.Physiol.Chemie
298 : 230 (1954)
- (109) KLENK, E., H. FAILLARD und H. LEMPFRID: Z.Physiol.
Chemie 301 : 255 (1955)
- (110) KLENK, E. und H. LEMPFRID: Z.Physiol.Chemie
307 : 278 (1957)
- (112) KLENK, E. und G. Uhlenbruck: Z.Physiol.Chemie
307 : 266 (1957)
- (113) KLENK, E. und G. UHLENBRUCK: Z.Physiol.Chemie
311 : 227 (1958)
- (114) KLENK, E.: Angew.Chemie 72 : 482 (1960)
- (115) KLENK, E.: und G. UHLENBRUCK: Z.Physiol.Chemie
319 : 151 (1960)
- (116) KLENK, E., U. LIEDTKE und W. GIELEN: Z.Physiol.
Chemie 335 : 275 (1964)
- (117) KLENK, E., L. HOF und L. GEORGAS: Z.Physiol.
Chemie 348 : 149 (1967)
- (118) KUHN, R. und R. BROSSMER: Angew.Chemie
68 : 211 (1956)
Chem.Berichte 92 : 1667 (1959)
- (119) KUHN, R. und R. BROSSMER: Chem.Berichte
89 : 2471 (1956)
- (120) KUHN, R. und R. BROSSMER: Angew. Chemie
70 : 25 (1958)
- (121) KUHN, R. und R. BROSSMER: Angew. Chemie
74 : 252 (1962)
- (122) KUHN, R. und P. LUTZ: Biochem.Z. 338 : 554 (1963)

LITERATURNACHWEIS

- (123) KUHN, R., P. LUTZ und D.L. MacDONALD:
Chemische Berichte 99 : 611 (1966)
- (124) LAURELL, A.B.: Acta Path.Microbiol.Scand.
47 : 182 (1959)
- (125) LEE, L.F. and C. HOWE: J.Bacteriol. 91 : 1418 (1966)
- (126) LEVENS, J.H. and J.F. ENDERS: Science (N.Y.)
102 : 117. (1945)
- (127) LEWIS, W.M. and M.E. RAFELSON jr.: Fed.Proc.
19 : 408 (1960)
- (128) LOWY, P.H., G. KEIGHLEY and H. BORSOCK:
185 : 102 (1960)
- (129) LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and
R.J. RANDALL: 193 : 265 (1951)
- (130) LUSH, D.: J.Comp.Path. 53 : 157 (1943)
- (131) LINEWEAVER, H. and D. BURK: J.Amer.Chem.Soc.
56 : 658 (1934)
- (132) MADOFF, M.A., E.H. EYLAR and L. WEINSTEIN:
I.Immunol. 85 : 603 (1960)
- (133) MÄKELÄ, O. and G. CANTELL: Ann.Med.exp.Biol.Fenn.
36 : 366 (1958)
- (134) McCLELLAND, L. and R. HARE: Canad.J.Pbl.Health
32 : 530 (1941)
- (135) McCREA, J.F.: Austral.J.exp.Biol.med.Sci.
25 : 127 (1947)
- (136) McCREA, J.F.: Austral.J.exp.Biol.med.Sci.
26 : 355 (1948)
- (137) McGUIRE, E. and S.B. BINKLEY: Fed.Proc.
21 : 172 (1962)
- (138) MEINDL, P. und H. TUPPY: Monatsh.Chem.
96 I : 802 (1965)
- (139) MEINDL, P. und H. TUPPY: Monatsh.Chem.
96 I : 816 (1965)
- (140) MEINDL, P. und H. TUPPY: Monatsh.Chem.
97 : 654 (1966)

LITERATURNACHWEIS

- (141) MEINDL, P. und H. TUPPY: Monatsh. Chem.
97 : 990 (1966)
- (142) MEINDL, P. und H. TUPPY: Monatsh. Chem.
97 : 1628 (1966)
- (143) MEINDL, P. und H. TUPPY: Monatsh. Chem.
98 : 53 (1967)
- (144) MOHR, E.: Z.Naturforsch. 15 b : 575 (1960)
- (145) MOHR, E. und G. SCHRAMM: Z.Naturforsch.
15 b : 568 (1960)
- (146) NOLL, H., T.AOYAGI and J.ORLANDO: Virology
18 : 154 (1962)
- (147) ODIN, L.: Nature (London) 170 : 663 (1952)
- (148) PIPER, W.: Acta Haematolol., Basel
18 : 414 (1957)
- (149) POPENOE, E.A. and R.M.DREW: J.Biol.Chem.
228 : 673 (1957)
- (150) POPENOE, E.A.: Biochem.Biophys.Acta
32 : 584 (1959)
- (151) PULIK, M.D.: Clin.Chim.Acta, Amsterdam
6 : 493 (1961)
- (152) PYE, W. and C.C.CURTAIN: J.Gener.Microbiol.
24 : 423 (1961)
- (153) RAFELSON, M.E. jr., J.CLOAREC, J.MORETTI and
M.F. YAYLE: Nature 191 : 279 (1961)
- (154) RAFELSON, M.E. jr., M. SCHNEIT and V.W. WILSON jr.:
Arch.Biochem.Biophys. 103 : 424 (1963)
- (155) ROBINSON, J.C. and J.E. PIERCE: Arch.Biochem.
106 : 348 (1964)
- (156) ROMANOVSKA, E.: Arch.Immunol.Terap.Dosw.
7 : 749,759 (1959)
- (157) ROMANOVSKA, E.: Naturwiss. 3 : 66 (1960)
- (158) ROMANOVSKA, E. and W.M. WATKINS: 87 : 37 P (1963)

LITERATURNACHWEIS

- (159) ROSENBERG, A. and E.CHARGAFF: J.Biol.Chem.
232 :1031 (1958)
- (160) ROSENBERG, A., B.BINNIE and E.CHARGAFF: J.Amer.
Chem.Soc. 82 :4113 (1960)
- (161) SCHNEIR, M., R.J.WINZLER and M.E.RAFELSON jr.:
Biochem.Frep. 9 : 1 (1962)
- (162) SCHRAIM, G. und E.MOHR: Nature (London)
183 :1677 (1959)
- (163) SCHWICK,G. und A.E. SCHULTZE: Clin.Chim.Acta,
(Amsterdam) 4 : 26 (1959)
- (164) SETO, J.T. and HOKAMA,Y: Annals N.Y.Acad.Sci.
Vol.21,Art.2, p.640 (1964)
- (165) SETO,J.T., R.DAZENIEK and R.ROTT: Biochem.
Biophys.Acta 113: 402 (1966)
- (166) SHILO, M.: Biochem.J. 66 : 48 (1957)
- (167) SOUPART, P. and T.H.CLEWE: Fertil.Steril.
16 : 677 (1965)
- (168) SPRINGER, G.F. and N.J.ANSELL: Proc.Natl.Acad.Sci.
USA 44 : 182 (1958)
- (169) SPRINGER, G.F. and N.J.ANSELL: Klin.Woschr.
1958 : 442
- (170) STERN, K. and R.WILLHEIM: "The Chemistry of
Malignant Tumors" Reference Press, N.Y. (1943)
- (171) STICKL, H.: Z.Immunol.Forschg. 118 : 135 (1959)
- (172) STONE, J.D.: Austral.J.exp.Biol.med.Sci.
25 : 137 (1947)
- (173) SPRINGER, J.F. and M.J. RAPOPORT: Proc.Soc.exp.
Biol.Med. 96 : 103 (1957)
- (174) SPRINGER, J.F.: Klin.Woschr. 1957 :1084
- (175) STICKL, H.: Z.Kinderheilk. 80 : 519 (1958)
- (176) STICKL, H. und H. Böcker: Z.Kinderheilk.
81 : 141 (1958)

LITERATURNACHWEIS

- (177) SCHILLING, R.F.: J.Lab.Clin.Med. 42 : 860 (1953)
- (178) TAMM, I. and F.L. HORSFALL: Proc.Soc.Exp.Biol.Med.
74 : 108 (1950)
- (179) TAMM, I. and F.L. HORSFALL: J.Exp.Med.
95 : 71 (1952)
- (180) THIELER, H. and G. ANGER: Klin.Wochr.
44 : 464 (1966)
- (181) THOMSEN, O.: Z.Immunol.Forsch. 45 : 851 (1926)
- (182) TOMBS, M.P., F. SOUTER and N.F. MACLAGAN:
73 : 167 (1959)
- (183) TRUCCO, R.E. and R. CAFUTTO: J.Biol.Chem.
206 : 901 (1954)
- (184) TUPPY, H., U. WEISSBAUER und E. WINTERSBERGER:
Monatsh.Chem. 94 : 321 (1963)
- (185) UHLENBRUCK, G.: Zbl.Bakt. (I.Referate)
177 : 197 (1960)
- (186) UHLENBRUCK, G.: Umschau 60 : 355 (1960)
- (187) DeVRIES, A., J. JERUSHALMY, A. ADLER, J. RECHNIG,
D. DANON and A. KOHN: 8. Kongr. Europ. Ges. Haematol.
S. 265, Wien 1961
- (188) WALOP, J.N., T.A.C. BOSCHMAN and J. JACOBS:
Biochem.Biophys.Acta 44 : 185 (1960)
- (189) WARBURG, O. und W. CHRISTIAN: Biochem.Z.
310 : 384 (1942)
- (190) WARREN, L.: J.Biol.Chem. 243 : 1971 (1959)
- (191) WARREN, L. and C.W. SPEARING: Biochem.Biophys.
Res.Comm. 3 : 489 (1960)
- (192) WARREN, L. and C.W. SPEARING: J.Bakteriol.
86 : 950 (1963)
- (193) WEISS, L.: Nature 191 : 1108 (1961)
- (194) WEISS, L., E. MAYHEW and K. Ulrich: Lab. Invest.
15 : 1304 (1966)
- (195) WEISSBACH, A. and J. HURWITZ: J.Biol.Chem.
234 : 705 (1959)

LITERATURNACHWEIS

- (196) WIELAND, T., P.DUESBERG und H.DETERMANN:
Biochem.Z. 337 : 303 (1963)
- (197) WINZLER, R.J. in: "The Plasma Proteins", Vol.I,
p.309, F.W. PUTMAN (Editor), Academic Press, N.Y.,
1960
- (198) ZILLEKEN, F., G.H.WERNER, R.V.SILVER and P.GYÖRGY:
Virology 3 : 464 (1957)
- (199) TSVETKOVA, I.V.: Biochimija T 30, p.407, N.Y. (1965).

LEBENS LAUF

Als drittes von vier Kindern der Eheleute Dr. med. Wilhelm Seggschneider und Dr. med. Regina Seggschneider, geb. Grosseck, wurde ich am 16. Mai 1939 in Neiße/Ober-schlesien geboren.

Nach dreijährigem Besuch der katholischen Volksschulen in Bonn und Köln wurde ich 1949 in das Staatliche Apostelgymnasium in Köln aufgenommen und legte dort am 27. Februar 1959 die Reifeprüfung ab.

Zur Ableistung des Grundwehrdienstes wurde ich am 6. April 1959 eingezogen und am 31. März 1960 als Fahnenjunker der Reserve entlassen. Am 2. Mai 1960 nahm ich das Medizin-studium in Bonn auf. Nach fünf vorklinischen Semestern legte ich am 9. August 1962 in Bonn die ärztliche Vor-prüfung ab. Nach 6 klinischen Semestern - zwei in Köln, eins in Freiburg und drei in Essen - bestand ich am 16. Dezember 1965 die ärztliche Prüfung am Klinikum Essen der Universität Münster.

Vom 1. Februar bis 31. Dezember 1966 war ich als Wissen-schaftliche Hilfskraft am Physiologisch Chemischen In-stitut der Ruhr-Universität Bochum tätig. Nach vier Mo-naten der Ausbildung an der Chirurgischen Abteilung des St. Elisabeth-Krankenhauses in Köln bin ich zur Zeit an der Gynäkologisch-Geburtshilflichen Abteilung des Kranken-hauses Marienhof in Koblenz als Medizinalassistent tätig.

Peter Seggschneider

